



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Unidad de Posgrado

**"Evaluación farmacológica de *Buddleia globosa*
("Matico") en el tratamiento de úlcera gástrica
inducida en animales de experimentación"**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Farmacología con
mención en Farmacología Experimental

AUTOR

Maritza Dorila PLACENCIA MEDINA

ASESOR

Pablo Enrique BONILLA RIVERA

Lima, Perú

2001



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

UNIDAD DE POSTGRADO



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR EN FARMACIA Y BIOQUÍMICA

Siendo las 11:00 a.m. del día lunes 06 de agosto del 2001, en el Salón de Grados de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, el Jurado Examinador y Calificador de Tesis, presidida por la Dra. Dra. Nancy Lozano Reyes e integrado por los siguientes miembros: Dr. Jorge Arroyo Acevedo, Mg. Pablo Bonilla Rivera (Asesor), Mg. Américo Castro Luna y Mg. Luis Rojas Ríos se reunieron para la sustentación oral y pública de la Tesis intitulada "EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA *BUDDLIA GLOBOSA* ('MÁTICO') EN EL TRATAMIENTO DE ÚLCERA GÁSTRICA INDUCIDA EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN" de la Bachiller **MARITZA DORILA PLACENCIA MEDINA** de la Maestría en Farmacología, con Mención en Farmacología Experimental.

Acto seguido se procedió a la exposición de la Tesis, con el fin de optar al Grado Académico de Magister en Farmacología con Mención en Farmacología Experimental. Formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por la graduando.

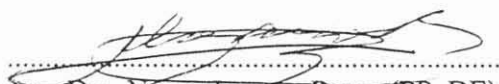
A continuación el Jurado Examinador y Calificador procedió a la votación, la que dio como resultado el siguiente calificativo:


Sobresaliente con recomendación de publicación (A)


Luego, la presidenta del Jurado declara a la Bachiller en Farmacia y Bioquímica **MARITZA DORILA PLACENCIA MEDINA**, Magister en Farmacología con Mención en Farmacología Experimental.


Siendo las 13:05 hs. se levanta la sesión.

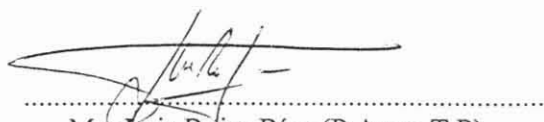
Se extiende el acta en Lima, a las 13:15 hs. del día lunes 06 de agosto del 2001


Dra. Nancy Lozano Reyes (PP, DE)
Presidenta


Dr. Jorge Arroyo Acevedo (PP, DE)
Miembro


Mg. Pablo Bonilla Rivera (PP, TC.)
Miembro


Mg. Américo Castro Luna (PP, DE.)
Miembro


Mg. Luis Rojas Ríos (P. Asoc. T.P)
Miembro

Observaciones:

"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"

*Dedicado a YAZMYN, KAREN, GRETTEL Y CAROLINA
con el amor de madre y amiga.*

*A mis Padres
HELÍ Y MARTHA,
Que con su ejemplo y esfuerzo hacen
posible estos logros y satisfacciones*

*A mis hermanos ;
Hugo, Yolanda, Clelia, Mirtha,
Y Moisés por su invalorable ayuda
con nobleza y constancia
en la realización de mis metas*

*A mis Maestros y Colegas:
Mi profundo agradecimiento por la Calidad
De Enseñanzas Académicas y por su amistad.
En forma muy especial a la Dra. Luz Oyola de Bardales
Al Dr. Roger Ramos- Aliaga por su dedicación a la Investigación
A nuestra inolvidable Madrina Dra. Alicia Darg Barbiere
Y a los integrantes de la Promoción Luis Pasteur*

*A mis colegas y Maestros de Química Y Farmacología
De la Facultad de Medicina, en forma muy especial
A la Dra. Hilda Jurupe Chico, Q.F. Gisela Oliveira
y al Dr. Manuel Núñez Por su invalorable enseñanza
y amistad. A mis asistentes de Investigación.*

AGRADECIMIENTOS

A los miembros del Jurado

Dra. Nancy Lozano Reyes (Presidenta)

Dr. Pablo Enrique Bonilla Rivera (Asesor)

Dr. Jorge Arroyo Acevedo

Mg. Luis Rojas Ríos

Mg. Américo Castro Luna

*A todos ellos por su correcta labor en la evaluación y
asesoría en la elaboración y presentación de esta investigación.*

La parte experimental del trabajo se realizó en los laboratorios de la Sección de Farmacología y el Bioterio de la Facultad de Medicina, y en los Laboratorios del Instituto de Recursos Naturales y Terapéuticos de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Este trabajo fue realizado con el apoyo económico parcial de Fundación para Investigación Científica KNOP – Chile.
Mi especial agradecimiento a los Doctores:
Reynaldo KNOP y Helmuth Goecke.

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	
ABSTRACT	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. GENERALIDADES	3
III. PARTE EXPERIMENTAL	7
IV. METODOLOGÍA	8
4.1 Preparación de la muestra: marcha fitoquímica.	9
4.2 Preparación de la muestra: estudio histológico.	15
4.3 Actividad antibacteriana.	
4.4 Métodos y procedimientos para estudios farmacológico.	12
4.5 Modelos experimentales de inducción ulcerativa.	13
4.6 Efecto del Extracto fluido de <i>B. globosa</i> sobre la contracción inducida por Acetil Colina e Histamina en la musculatura lisa de duodeno e ileon de rata.	16
V. RESULTADOS	
5.1 Estudio botánico de <i>Buddleia globosa</i> .	17
5.2. Resultado del Estudio Fitoquímico del extracto de <i>Buddleia globosa</i> .	19
5.3. Resultados de la Evaluación Antimicrobiana del extracto fluido <i>Buddleia globosa</i> : Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)	28
5.4. Resultados de los estudios farmacológicos: Bioensayo de toxicidad en Artemia salina. Dosis Letal 50	31
5.5. Resultado de los modelos experimentales de inducción ulcerativa.	31
5.6 Efecto del extracto de <i>Buddleia globosa</i> Sobre la contracción inducida por Acetilcolina e Histamina en la musculatura Lisa de íleon de rata.	40
VI. DISCUSIÓN	43
VII. CONCLUSIONES	50
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

RESUMEN

Buddleia globosa Hoppe (Matico); es un arbusto que crece desde Santiago a Valdivia en Chile, se le atribuye tradicionalmente efectos antiúlcerosos. La investigación farmacológica de esta planta se inició con el estudio histológico de las hojas y tallo, determinación de la composición química del extracto etanólico, purificación, determinación de la actividad antibacteriana, los bioensayos de Toxicidad en ***Artemia salina*** y se determinó la DL₅₀ en ratones albinos Cepa CF-1. Se realizó la Verificación de la actividad antiulcerosa gástrica en diferentes modelos experimentales de inducción ulcerativa entre ellos: estrés por restricción e hipotermia (4° C), estrés quirúrgico de ligadura de píloro e inmovilización, y por inoculación de ***Helicobacter pylori***. y el estudio del efecto sobre la musculatura lisa en órganos aislados.

En el estudio histológico, las hojas presenta excrecencias en determinadas células con la apariencia de bolsa oleífera, como depósito de compuestos volátiles y aromáticos, es una planta de estructura secundaria. De los estudios fitoquímicos del Extracto Etanólico de hojas y tallo (EFM) se encontró flavonoides, como Quercetina y Rutina, taninos, alcaloides, y compuestos fenólicos de los cuales se aisló 5 fracciones, por cromatografía en capa fina y por espectrofotometría UV; identificadas como F1: 6-Aquil – 4' – hidroxil – 7-O – Glicosil Isoflavona, F2: 5,7,8 – Trihidroxil – 4' – O – Metil Flavona, F3: 5,7 – Dihidroxil – 6,8 – di-O – Metil Flavona, F4: 5,7 – Dihidroxil – 6,8 – Dialquil Flavona, F5: 6,8 – Dialquil – 4' – hidroxil – 7 – O – Metil Isoflavona,. La mejor y mayor actividad biológica mostrada se obtuvo con el EFM. La CL₅₀ de ***Artemia salina*** fue 300 ppm y DL₅₀ en ratones no mostró efecto hasta 2000 mg/Kg. En los estudios de actividad antiulcerosa del EFM frente a estrés e hipotermia demostró una protección del 85%, resultado estadísticamente significativo ($p < 0.05$) similar al patrón Ranitidina, en el modelo quirúrgico de ligadura del píloro e inmovilización para inducción ulcerativa el EFM protegió un 58%, frente a Ranitidina 54% y al Bismuto con 42% , y en el modelo inducidas por H. Pylori se verifica su actividad de protección y recuperación de la mucosa gástrica con un 60% de inhibición de ulceración mientras que Claritromicina + Ranitidina + Bismuto drogas de elección ejercen un 70% de esta inhibición. Finalmente se comprobó un marcado efecto relajante del ***B. globosa***, en las contracciones intestinales de íleon y duodeno, especialmente aquellas inducidas por Acetilcolina.

La ***Buddleia globosa*** (**Matico**) presenta un marcado efecto antiulceroso en nuestros modelos experimentales. Los alcaloides, los taninos, flavonas e isoflavonas presentes en el extracto podrían ser los responsables por esta actividad, así como del efecto relajante en la musculatura lisa, posiblemente por antagonismo de Acetilcolina: confirmando un elevado potencial terapéutico.

Palabras claves: ***Buddleia globosa***, **antiulceroso**, **matico**.

ABSTRACT

Buddleia Globosa Hoppe (Matico); it is a bush that grows from Santiago to Valdivia in Chile, is attributed goods antiúlcerosos traditionally. The pharmacological investigation of this plant begins with the histological study of the leaves, the determination of the chemical composition of the active complex of the extract etanólico, purification of the active components, the determination of the antibacterial activity, the bioassays of Toxicity in *Artemia* saline and the DL50 was determined in mice albino Stump CF-1. The Verification of the activity gastric antiulcerosa in different experimental models of induction ulcerativa among them: stress of cold (4°C), surgical stress of pylorus bond and immobilization, and for inoculation of *Helicobacter pylori*, and finally the study of the effect on the flat musculature in models of isolated organs.

In the histological study, the leaves show excrescence in certain cells with the appearance of oleiferous bag, as deposit of compound volatile and aromatic, it is a plant that presents secondary structure. Of the studies fitoquímicos of the EFM (leaves and shafts) we found flavonoides: Quercetin and Rutine, as well as tannins (5.0 to 5,7%), alkaloids, and compound phenolic of which was isolated 3 fractions, identified as F1: 6-Aquil-4'-hidroxi-7-O-Glicosil Isoflavona, F2: 5,7,8-Trihidroxi-4'-O-Metil Flavona, F3: 5,7-Dihidroxi-6,8-O-di-Metil Flavona, F4: 5,7-Dihidroxi-6,8-Dialquil Flavona, F5: 6,8-Dialquil-4'-hidroxi-7-O-Metil Isoflavona, for chromatography in fine layer and for espectrofotometría UV. The best and bigger shown biological activity was obtained with the EFM.. In the CL50 of saline *Artemia* was 300 ppm and the DL50 in mice they didn't show effect up to 2000 mg/Kg. In the studies of activity antiulcerosa of the EFM in front of stress and cold found a protection of 85%, been statistically significant ($p < 0.05$), similar to the patron Ranitidina, in the surgical pattern of bond of the pylorus and immobilization they threw 55%, and in those induced ones for *H. pylori*. Finally a marked effect relaxant of the EFM, was verified *B. globosa*, in the intestinal contractions of ileon like of duodenum, especially those induced ones for Acetylcholine.

Of what we can conclude: The *Buddleia Globosa* (Matico) it presents a marked effect antiulceroso in our experimental models: the alkaloids, the tannins, flavonas and present isoflavonas in the extract could be the responsible ones for this activity, as well as of the effect relaxant in the flat musculature, possibly for antagonism of Acetylcholine: confirming a high therapeutic potential.

Passwords: *Buddleia globosa*, antiulceroso, matico.

I. INTRODUCCIÓN

El uso tradicional de plantas con acción medicinal atribuida por sus consumidores, genera la expectativa de investigar para dar un respaldo científico a lo que se trasmite oralmente. En nuestro medio la úlcera gástrica es una enfermedad poblacional que esta cada día en aumento, y está asociada a múltiples factores entre ellos, anatómicos, fisiopatológicos, farmacológicos y bacterianos por *H. pylori*. La terapéutica de esta enfermedad incluye a los bloqueadores de receptores H₂, antiácidos, antibacterianos, bloqueadores de la bomba de H⁺K⁺ ATPasa, anticolinérgicos y últimamente a los compuestos naturales como flavonoides.

En nuestro país hay estudios del efecto antiulceroso y cicatrizante de *Piper angustifolium* (Matico), desarrollado a nivel experimental; Placencia 1997; Arroyo 1998. En Chile también se tiene una planta a la que se atribuye este efecto antiulceroso y corresponde a la especie: *Buddleia globosa* Hoppe, Mellado 1985; así como efectos antihemorrágicos, antiinflamatorios y antitumígeno. Farga C. 1990, Knop 1996, y en mérito a esta información, es que para verificar este efecto antiulceroso se realizó tres modelos de inducción ulcerativa en animales de experimentación, establecer que tipo de extracción es la más adecuada, aislar los principales metabolitos secundarios de esta preparación, así como tratar de elucidar el probable mecanismo de acción involucrado.

En esta investigación se utilizó tres modelos de inducción ulcerativa: Modelo de Estrés por Inmovilización e Hipotermia a 4° C, Modelo de Estrés Quirúrgico por ligadura pilórica e inmovilización y finalmente el Modelo por inoculación de *Helicobacter pylori*, microorganismo presente en la formación de úlceras gástricas en el 95% de todos los casos; López Brea 1995 (4). Se realizó estudios de actividad antimicrobiana del extracto fluido etanólico de *B. globosa* frente a Cepas ATCC de *S. aureus*, *E. coli*, *H. pylori* silvestres. Lo que nos permitió obtener la dosificación de tratamiento frente a la infección producida por inoculación del *H. pylori*.

La presente investigación pretende valorar la acción terapéutica de una planta con los criterios analíticos científicos caracterizando: El análisis químico por marcha fitoquímica, análisis cromatográficos y Espectrofotométrico U V con reacciones de sustitución y desplazamiento; Bioquímico, Microbiológico, Estudio Anatomopatológico y la utilización de vías directa a receptores farmacológicos del tipo colinérgicos e histaminérgicos, todo ello con el propósito de poder explicar el efecto farmacológico antiulceroso del extracto fluido de *Buddleia globosa* (Matico).

En esta investigación se fijó como objetivo general:

“Evaluar farmacológicamente la *Buddleia globosa* hoppe (“Matico”) en el tratamiento de úlceras gástricas inducidas en animales de experimentación”.

Para alcanzar este objetivo fue necesario desarrollar lo siguientes:

1. **Estudio Fitoquímico:** Caracterizar los principales metabolitos secundarios del extracto fluido de *Buddleia globosa*.
2. **Estudio botánico:** Identificar las características histológicas por tinción de las hojas y tallo.
3. **Estudio Antimicrobiano:** Evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto fluido de *Buddleia globosa*:
 - a. Determinar la concentración inhibitoria mínima (MIC), frente al *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus*, y *Escherichia coli*.
4. **Estudio Farmacológico** que comprende :
 - 4.1. **Toxicidad Aguda DL 50** en ratones albinos Cepa CF-1 (CYTED. 1995)
 - 4.2. Determinar la CL₅₀ a través de bioensayo en *Artemia salina* (CYTED. 1995).
 - 4.3. **Actividad Antiulcerosa.** Determinar la actividad antiulcerosa gástrica del extracto fluido de *B. globosa* en ratas:
 - Úlceras inducidas por estrés de frío (4°C).
 - Úlceras inducidas por estrés de inmovilización y ligadura de píloro.
 - Úlceras inducidas por inoculación de *Helicobacter pylori*.
 - 4.4. **Actividad sobre la musculatura lisa intestinal.**
 - Determinar del efecto del extracto fluido de *B. globosa* en contracciones de órganos aislados (duodeno e íleon) de rata inducidas por Acetilcolina e Histamina.

Todas estas determinaciones químicas y evaluaciones farmacológicas se realizaron en los Laboratorios del Instituto de Química Orgánica y el Instituto de Recursos Naturales y Terapéuticos de la Facultad de Farmacia y Bioquímica U.N.M.S.M.

Las evaluaciones farmacológicas en los Laboratorios de Farmacología del Departamento de Ciencias Dinámicas, Facultad de Medicina U.N.M.S.M.

La investigación Bioquímica y Microbiológica en los ambientes del Hospital Central de Seguridad Social "Guillermo Almenara Irigoyen" EsSalud.

II. GENERALIDADES

La úlcera péptica o gastroduodenal es una enfermedad, que se presenta en un alto porcentaje en los adultos; constituyendo un gran problema social y con gran repercusión económico y un motivo de preocupación en investigadores y especialistas.

Inicialmente, existía una inquietante ignorancia, en la etiología de la enfermedad y la elección del tratamiento, había sido en gran parte empírica. Hoy, se puede entender mejor, los mecanismos por los cuales se produce la enfermedad, ya que se han desarrollado investigaciones, para entender las vías de su formación y evolución, mejorando las posibilidades de un adecuado tratamiento.

La etiología de la mayoría de las enfermedades radica en la interacción entre los factores ambientales y genéticos. Sólo los individuos sensibles, desarrollan la enfermedad, siendo difícil, obtener todas las pruebas disponibles, para explicar las causas de las mismas. En el caso de la úlcera gástrica, la atención se ha centrado en algunos trastornos fisiológicos, como la secreción del ácido, anomalía pilórica, aumento en la secreción de gastrina, trastornos de la motilidad del píloro, disminución del moco protector de la mucosa gástrica: así como en el uso de antiinflamatorios no esteroideos (AINES) y la asociación de la presencia de *Helicobacter pylori*, como el agente etiológico en el desarrollo de la misma, López - Brea M. 1995, (4,5,6,7)

Se ha propuesto que por una anomalía pilórica, hay un retraso en el vaciamiento gástrico, con la posterior distensión del antro, lo que produce un aumento de la secreción de gastrina, con el consiguiente incremento de ácido. Por otro lado habría un reflujo del contenido duodenal al estómago. El duodeno, tiene principalmente ácidos biliares, los cuales producen gastritis más acentuada en el segmento distal del estómago. La mucosa lesionada propende a la úlcera, que puede ser adyacente a esta zona. La bilis despoja de moco al epitelio, por lo que pierde su agente protector, al mismo tiempo se rompe la barrera mucosa, con provocación de una gastritis aguda(8,9,10,11)

La secreción gástrica, está regulada por un mecanismo nervioso humoral, a través del sistema parasimpático (nervio vago) y un mecanismo humoral a través del sistema hipófiso adrenal por ello, se dice que la secreción ácida tiene poca importancia al principio de la formación de la úlcera péptica.

Los primeros estudios experimentales utilizaron métodos de acción local (sustancias químicas, traumatismos, exposición a los rayos X, infección, obstáculos pilóricos y alteraciones del sistema circulatorio.) y métodos de acción sistémica (quemaduras, inmunización, trastornos de la nutrición y endocrinos); y el finalmente procedimientos quirúrgicos, que alteran la fisiología normal (gastroentero-anastomosis, desviación de las secreciones duodenales y úlceras yeyunales postoperatorias.)

Otra manera que se produzcan úlceras en ratas es mediante el método de restricción de movimientos e hipotermia; las lesiones producidas dependen del tiempo en que permanezcan en este estado. La privación de movimientos (eliminación de la respuesta de huida), generan hemorragias y erosiones en la mucosa gástrica. Así se tiene el método de inducción de úlceras por efecto de frío a 4° C e inmovilización durante 3 horas de Senay E.C. 95 (12,13,14).

También se producen úlceras por estrés quirúrgico de ligadura de píloro e inmovilización; este modelo además permite evaluar el contenido de las secreciones gástricas y las lesiones de la mucosa gástrica. CYTED – 93(15) .

La asociación entre H. Pylori y úlcera esta ampliamente demostrada (4,5,6,7), y esta investigación se inoculaban cultivos de *Helicobacter pylori* a los animales de experimentación con el propósito de generar en ellos una respuesta ulcerativa como un modelo alternativo de estudio.

En la terapia de la úlcera péptica se han utilizado una serie de medicamentos, Goodman y Gilman 1996(8), entre ellos:

1. Anticolinérgico: Pirenzepina.
2. Antagonistas de los receptores H2 : (Cimetidina, Ranitidina).
3. Inhibidores de la bomba de protones (Omeprazol, Lanzoprezol).
4. Citoprotectores (Dicitrato de Bismuto).
5. Neutralizantes como Hidróxido de Magnesio.

Todos los fármacos mencionados son principios activos de síntesis, en los cuales se ha definido claramente su mecanismo de acción.

La tradición del uso de plantas medicinales en Perú, Chile, Bolivia, Argentina, Colombia y Brasil data de tiempos pre -incaicos. En la población rural y selvática de nuestro país se conservan ampliamente los usos tradicionales de las plantas de acción medicinal, destacando entre ellas las de acción antiulcerosa. A pesar de su uso extenso no todos los productos utilizados tienen un valor medicinal claramente reconocido o verdadero.

En nuestro medio el empleo de "matico" ha sido ampliamente difundido atribuyéndole el efecto antiulceroso. Esta denominación corresponde a dos especies diferentes: *Buddleia globosa* y *Piper angustifolium*.

En otros países latinoamericanos plantas medicinales pertenecientes a otras especies también reciben esta denominación, las cuales pueden inducir a confusión en el momento de comparar resultados farmacológicos. El uso de la *Piper angustifolium* ("Matico"), planta medicinal de actividad antiulcerosa; Placencia 1997(16), con estudio de acción cicatrizante y antiulcerosa Arroyo 1998(17), es bastante difundido sobretudo a nivel de la Sierra región central de nuestra patria. En el Perú; matico pertenece a la familia *Piperaceae* que consta de 10 a 12 géneros y cerca de 2000 especies. En esta familia, el genero de mayor importancia para el hombre es el *Piper* que incluye muchas especies de valor comercial y medicinal (18,19).

En Chile se utiliza la *Buddleia globosa* hoppe (Matico), en extracto fluido con propiedades cicatrizantes y antihemorrágico por su acción sobre las mucosas gastrointestinales. Así también se le atribuye eficacia en la enterocolitis. Se emplea en forma de infusión, para lavar heridas; ingerido para aliviar la inflamación del tracto respiratorio y como antitusígeno y contra la diarrea y disentería (Farga 1990(2), KNOP 1997(3).



Figura 1. Fotografía en la que se muestra la *Buddleia globosa* ;

Familia: Loganiaceae;

Género: Buddleia;

Especie: Buddleia globosa Hoppe.

Buddleia globosa Hoppe es un arbusto de 2 a 2.5 m de altura, con ramas densamente pobladas. Las hojas son opuestas de 15 cm de largo, lanceoladas, de borde entero, terminales en peciolo corto, con inervación central, rugosas en la superficie superior, ápice agudo, base obtusa .

Las inflorescencias se presentan por pares, dispuestas en racimos capituliformes, los pedúnculos de 2 a 3 cm; las cabezuelas son globosas de corola corta y amarilla. Los estambres son casi sésiles. Crece en climas fríos y desde 1300 a 2500 msnm desde Santiago a Valdivia en Chile,.

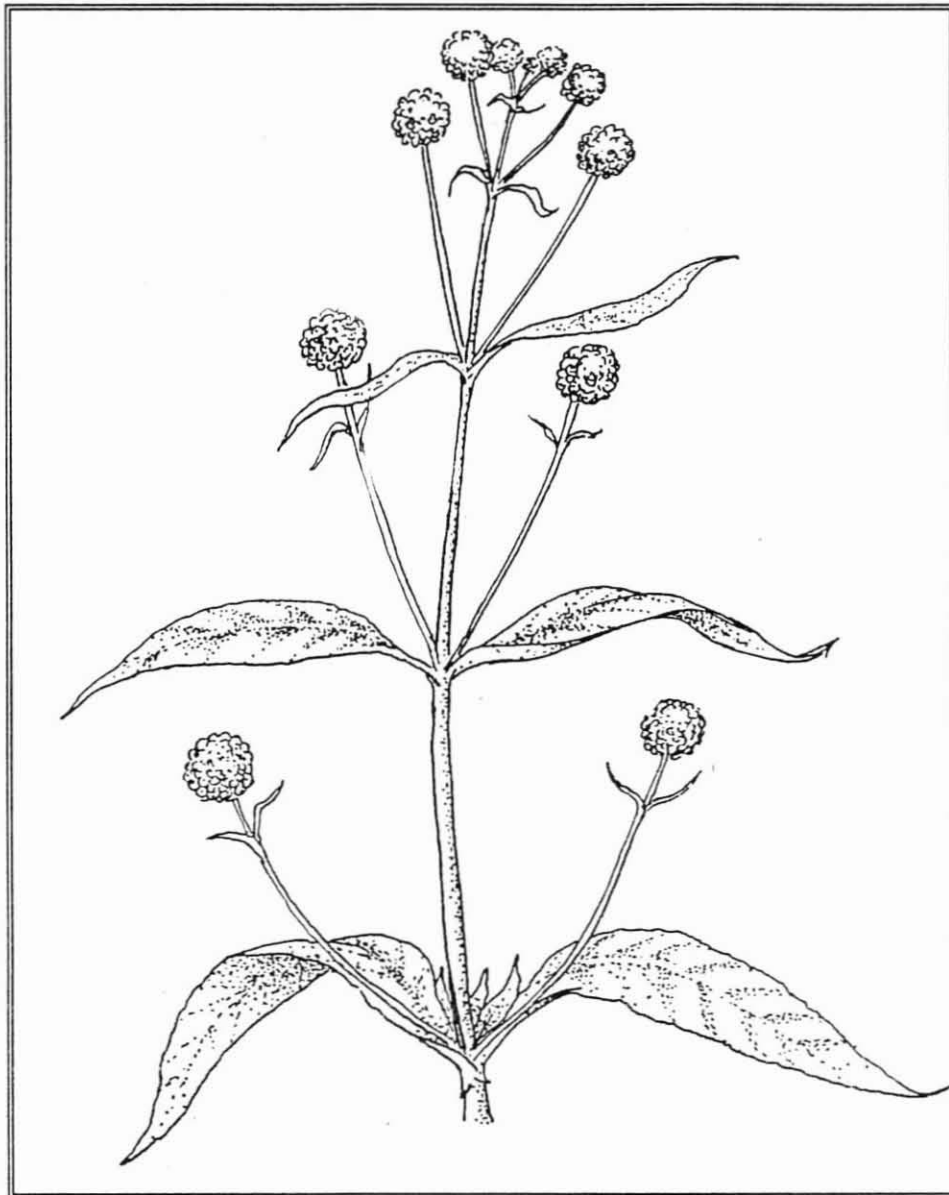


Figura 1.2. Se presenta el esquema gráfico de la Representación de la ***Buddleia globosa*** tomado de Mellado Gutiérrez 1923.

III. PARTE EXPERIMENTAL

MATERIAL Y MÉTODOS:

En esta investigación se utilizó lo siguiente:

3.1 Material Farmacológico:

- Acetilcholine Iodide (2260-50-6) SIGMA CHEMICAL Co. St. Louis.
- Histamine (2-(4- Imidazolyl)ethylamine)EEC.200-100-6. SIGMA CHEMICAL Co. St. Louis.
- Cloruro de Calcio dihidratado. Merck Darmstadt
- Cloruro de Magnesio Heptahidratado. Merck Darmstadt
- Cloruro de Potasio. Merck Darmstadt
- Acetato de Sodio anhidro. Merck Darmstadt
- Dicitrato de Bismuto.(Laboratorios COFANA. Lima. Perú)
- Ranitidina. (Laboratorios ABEEFE Lima. Perú).
- Claritromicina (Laboratorios GLAXO. Importada Para Perú)
- Extracto fluido de *Buddleia globosa* ("Matico"). Santiago de Chile.
- Pentobarbital Sódico.

3.1.1. Equipos e Instrumental :

- Equipo de disección completo (pinzas , bisturí y hojas de bisturí)
- Agujas con hilo de sutura 2,00
- Equipos Instrumentales de Medición:
- Espectrofotómetro U.V. y Visible Helewt Packard. Modelo N° 8452 A Jet Paper
- Quimografo Eléctrico modelo 441(HARVARD APPARATUS Co. Inc. Dover MASS.)
- Equipo de Órganos Aislados.
- Equipo de Cromatografía de capa fina.
- Lámpara de Luz Ultravioleta 266 nm. Y 282 nm.
- Equipo para cromatografía en capa fina.
- Equipo para cromatografía en columna rápida.

3.1.2. Diseño estadístico:

Para el tratamiento estadístico de la evaluación de los resultados se utilizó una computadora con Procesador Pentiumm con los paquetes estadísticos de :Análisis de varianza . Diseño de Regresión con Variables Múltiples. Métodos computarizados Statgraphics.

3.2. Material biológico:

- 150 ratas Sprague Dawley ; machos adultos jóvenes de un peso promedio de 350 gramos provenientes del Bioterio del Instituto de Nutrición del Ministerio de Salud.
- 50 ratones albinos machos Cepa CF-1, peso promedio 25 gramos, provenientes del Bioterio de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Cepas ATCC de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, cepas conservadas a – 70°C en Nitrógeno Líquido y donadas por el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.
- Material a investigar: Extracto fluido de las hojas frescas de *Buddleia globosa* hoppe, recolectadas de la Fundación Knop, Santiago de Chile, en el mes de Diciembre, época de cosecha preparadas al 20 % g/mL en alcohol de 70%. Obtenido el extracto se lleva a evaporación el contenido alcohólico para utilizarla en las diferentes pruebas.

IV. METODOLOGÍA

4.1. Marcha fitoquímica. Dominguez X. 1985, Lock de Ugaz 1994.

Se realizaron dos extractos: Etanólico y acuoso al 20%. Se realizaron las separaciones en los diferentes solventes de polaridad crecientes(Benceno- agua) en una columna rápida con soporte de silica gel granulada para columna.

- Una vez separados los diferentes grupos de acuerdo a su polaridad se realizaron las separaciones en cromatografía en capa fina para determinar los diferentes componentes del grupo.
- Determinación de los compuestos químicos por espectrofotometría ultravioleta. Una vez que se obtuvieron las separaciones cromatográfica en capa fina y determinados su Rf. Se realizaron la determinación en espectrofotometría con metanol como solvente. Se realizaron las pruebas de desplazamiento de los grupos polares y las reactividades de estos con reactivos específicos. Bruneton J. 1995(26), Mabry J.1970 (27)
- Los resultados se presentan en los cuadros del 5 al 11 y los espectros correspondientes.

4.2. Recolección de Muestra:

- Se recolectaron las plantas frescas enteras de los campos de Quilpue en Santiago de Chile, altitud aproximada 1300 msnm, seleccionando las hojas para ser secadas al medio ambiente, y posteriormente molidas para su maceración hidro alcohólica al 70 % hasta obtener el extracto fluido, la recolección se realizó en las primeras horas de la mañana.
- Para la realización de los estudios histológicos del tallo así de las hojas de B. globosa se realizaron los cortes de los respectivas partes de la planta fresca y se hicieron las fijaciones y las tinciones de lugol para la preservación de los mismos.

4.3. Determinación de la Actividad antibacteriana: *Baker C.N. 1983*

Para mostrar este efecto se utilizaron técnicas microbiológicas para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto fluido de *B. globosa* en cepas ATCC. Entre las cepas tenemos *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Se utilizaron cepas silvestres de *Helicobacter pylori* obtenidas de biopsias recientes de pacientes con diagnóstico clínico de úlceras gástricas. Se realizaron pruebas de morfología y los cultivos para determinar ureasa positiva. Las cepas se conservaron a -70°C en nitrógeno líquido y fueron viabilizadas por cultivos sucesivos dos semanas previas a la realización de la prueba.

Las cepas de *E. Coli* ATCC 25922 en Agar Mc. Conkey. *S. aureus* ATCC 25923 en Agar Manitol Salado y las cepas *H. pylori* en Agar Mueller – Hinton con suplemento de sangre desfibrinada de carnero al 5%.

4.3.1. Técnica del Concentración Mínima Inhibitoria (MIC), para el extracto fluido de *Buddleia globosa*. *Baker C N. 1983(28)* SAHM D. F, Neuman M.A.1988 (29)

- a) Mantener viables e identificadas las cepas ATCC y las cepas silvestres de *H. pylori*, 18 a 24 horas previas a la inoculación.
- b) Con todo el material de vidrio esterilizado:
Placas Petri, pipetas de 1 ml, 10 ml, tubos de 13 x 100 y 16 x 150 con tapa, asas de Kolle estériles; y el ambiente en condiciones controladas de temperatura y asepsia se procede a la numeración respectiva de las placas y los tubos para las diluciones convenientes .

2.1 El día del Ensayo. Se realiza la preparación de las placas con Agar Mueller – Hinton, el medio ya preparado, esterilizado y disuelto a una temperatura entre los $55-60^{\circ}\text{C}$ se suplementó con la suspensión de sangre de carnero desfibrinada al 5% y se vierte a las placas en volumen de 15 mL en cada una. Se tiene el material listo para realizar el ensayo.
- c) Preparación del Inoculo:
Usando una asa de Kolle calibrada, transferir colonias de los cultivos de las cepas ATCC, y la de *H. pylori*. A tubos estériles con una solución de caldo de cultivo TSB, homogeneizar utilizando un vortex y se compara con un patrón de la Escala de Mc. Farland 0.5 de turbidez estándar, equivalente a 1.5×10^8 CFU/mL se le llamara Suspensión Stock.

d) Preparación de las diluciones.

De la suspensión Stock. Se realizan diluciones 10^7 , 10^6 , 10^5 tratando de que el tiempo en que se realizan las diluciones y el tiempo de la siembra no sean mayor de 1 hora. Estas diluciones deben mantenerse en una temperatura de 4°C .

e) De la diluciones:

De acuerdo a las recomendaciones reportadas Sahm (21), se trabajaron desde 5,120 ug/mL de la solución antimicrobiana. Extracto Fluido de Buddleia globosa hasta una concentración final de 0,0390ug/mL.

Los datos se detallan en el cuadro 1.

Cuadro 1 : Dilución para la determinación de la concentración inhibitoria mínima del extracto fluido de *Buddleia globosa* :

Punto	Conc. Inicial $\mu\text{g/mL}$	Vol. Agua destilada	Conc. Intermed. $\mu\text{g/mL}$	Con. Final $\mu\text{g/mL 1:10}$	Concentración Final en placa μg
1	5120	0	5120	512	5120
2	5120	1	2560	25.6	2500
3	5120	3	1280	12.8	1280
4	1280	1	640	6.4	640
5	1280	3	320	3.2	320
6	1280	7	160	1.6	160
7	160	1	80	8.0	80
8	160	3	40	4.0	40
9	160	7	20	2.0	20
10	20	1	10	1.0	10
11	20	3	5	0.5	5
12	20	7	2.5	0.25	2.5
13	2.5	1	1.25	0.125	1.25
14	2.5	3	0.625	0.0625	0.625
15	2.5	7	0.315	0.0315	0.315
16	0.315	1	0.156	0.0156	0.156
17	0.315	3	0.078	0.0078	0.078
18	0.315	7	0.039	0.0039	0.039

f) De la Siembra:

Realizada las diluciones del extracto y depositadas en los tubos se vierten en las placas, se hacen rotaciones sucesivas con la finalidad de tener una dispersión homogénea del medio, hasta solidificación.

Ya listas se procede a la siembra de los microorganismos ATCC en las placas solidificadas usando diluciones de siembra 10^6 , y 10^5 UFC/mL mediante asa calibrada de 10^{-3} .

En cada placa se deposita una asa por vez realizando una ligera rotación con la finalidad de depositar todo el inóculo en ese punto. El tiempo total de siembra no debe ser mayor de dos horas, iniciando desde la menor concentración y se coloca una placa control de Agar MH y dilución Stock de las cepas ATCC al empezar la siembra y al final de esta.

g) Incubación:

Se incubó las placas a 35° C en condiciones de microaerofilia usando bolsas generadoras de CO₂ , con catalizador e indicador incluido, por 18 a 24 horas en los recipientes de anaerobiosis.

Transcurrido este tiempo se realizaron las lecturas y los resultados se presentan en sus respectivos cuadros

4. 4. Estudio Farmacológico.

4.4.1 Bioensayo de Toxicidad en *Artemia salina*. (14)

El Bioensayo con *Artemia salina* es un método que permite determinar citotoxicidad en la larva de este crustáceo, el que es altamente sensible, a una gran variedad de sustancias químicas. Se realizó diluciones de extracto fluido de *B. globosa* al 20% las cuales se detallan en el siguiente cuadro:

Cuadro 2 : Bioensayo con *Artemia salina*

Grupo	Número de larvas	Dilución final en ppm
1	10	1000
2	10	300
3	10	100
4	10	30
5	10	10
6	10	3
7	10	1

Las larvas en número de 10 se mantuvieron en un medio salino evaluándose la viabilidad a las 24 y 48 horas después del tratamiento con extracto fluido de *B- globosa* en las concentraciones indicadas en el cuadro.

4.4. 2 Toxicidad Aguda. Determinación de la Dosis Letal 50. (14).

La toxicidad aguda cuantifica los efectos que ocurren dentro de un lapso de 24, 48 y 72 horas con posterioridad a dosis múltiples.

Se empleó ratones albinos jóvenes de una cepa CF-1 de 40 días de vida provenientes del Bioterio de la Facultad de Medicina Veterinaria, con un peso promedio de 25 gramos.

El tamaño de la muestra fue de 50 ratones, para las dosis siguientes:

Cuadro 3 : Dosis letal 50 : Toxicidad aguda en ratones

Grupo	Nº de animales	Dosis mg/Kg.
1	10	2000
2	10	1000
3	10	500
4	10	100
5	10	10

La administración de las dosis fue en ayunas de 24 horas mediante cánula rígida de acero inoxidable vía intragástrica, y con agua *ad libitum*, mantenidos en una temperatura constante de 25° C.

El tiempo de observación fue de 24, 48, y 72, horas después de la administración del extracto fluido de *B. globosa*.

4.5 Modelos experimentales:

4.5.1 Evaluación de la actividad Antiulcerosa del Extracto Fluido de *Buddleia globosa*.

Modelo de inducción ulcerativa: Estrés de Restricción e Hipotermia 4° C.(12,13)

Protocolo experimental:

- Se utilizó 60 ratas adultos machos jóvenes de raza *Sprague-Dawley* de 250 a 300 g provenientes del Bioterio del Instituto de Nutrición del Ministerio de Salud Los animales se mantuvieron sólo con agua *ad libitum* por 48 horas antes de la experiencia,.
- Las soluciones administradas fueron:
a)Ranitidina (100 mg/Kg.) en solución acuosa, b) Extracto fluido de *Buddleia globosa*: (200 mg/Kg) ó c) Agua destilada como control positivo (10 mL/Kg.).

- La administración de los fármacos fue mediante cánula rígida de acero inoxidable vía intragástrica y media hora después los animales fueron introducidos en tubos rígidos de plástico y colocados en cámaras refrigerantes a 4° C durante un periodo de 03 horas.
- Transcurrido este tiempo los animales fueron sacrificados con la administración de Pentobarbital (50 mg/Kg. IP). Se les efectuó laparotomía y se extrajeron los estómagos, los que se abrieron por la curvatura mayor.
- Se extienden los estómagos en una superficie de fijación mediante alfileres, se observa y se cuantifica las zonas ulcerativas según la Escala de Marhuenda (CYTED 1995).
- También se realizó el estudio con un grupo sin restricción de alimentación de 48 horas, para verificar si este proceso produciría ya una alteración en los animales de prueba.

4.5.2 Evaluación de la actividad Antiulcerosa del Extracto Fluido de *Buddleia globosa*.

Modelo de inducción ulcerativa: Estrés Quirúrgico(Ligadura de píloro) e inmovilización(14).

Protocolo experimental:

- Se utilizó 40 ratas adultos jóvenes machos de raza Sprague-Dawley de 300 – 400 g provenientes del Bioterio del Instituto de Nutrición del Ministerio de Salud
- Los animales se mantuvieron con agua *ad libitum* por 48 horas antes de comenzar la experiencia,.
- Los animales fueron anestesiados por inhalación de éter dietílico y se les realizó una laparotomía para ligar el píloro, luego de su recuperación se les administró por cánula rígida de acero inoxidable vía intragástrica lo siguiente:
 - a) Ranitidina (100 mg / Kg.) en vehículo acuoso,
 - b) Extracto fluido de *Buddleia globosa* (200 mg / Kg)
 - c) Subsalicilato de Bismuto (5.7mg/Kg)
 - d) Agua destilada(10 mL / Kg.).
- Transcurrido 4 horas en las cuales las ratas permanecieron inmovilizadas, fueron sacrificadas, con la administración de Pentobarbital (50 mg /Kg.) IP.
- Se efectuó laparotomía y se les ligó el cardias , se extrajeron los estómagos, se midió el total del contenido gástrico, determinándose también: pH, Cloro, Glucosa, Sodio (Na⁺), Potasio (K⁺) y Proteínas totales: albúmina, globulina.
- En los estómagos se observó y cuantificó las zonas ulcerativas utilizando la escala de Marhuenda (CYTED 1995) para su evaluación.

4.5.3 Por Inoculación de *Helicobacter pylori*.

Protocolo experimental:

Se utilizó 78 ratas adultos jóvenes machos de la cepa *Sprague Dawley* de 300-400 g de peso, provenientes del Bioterio del Instituto de Nutrición del Ministerio de Salud.

A los animales se les inoculó con sonda rígida de acero inoxidable una alícuota equivalente a 100,000 UFC/ml ($= 10^5$) de un cultivo de *Helicobacter pylori* del medio Mueller-Hinton con suplemento de sangre desfibrinada de carnero al 5%.

De los 78 ratas inoculadas se evaluó aleatoriamente a 18 de ellas, 6 de cada subgrupo con el fin de confirmar la infección en el estómago y esta se realizó por estudios histopatológicos de las mucosas, verificándose la presencia de *H. pylori*, en los diferentes niveles de estratificación de este tejido. Esta injuria, causada por el microorganismo, se estudió a partir del 3º día, hasta lograr el estadio de penetración del *H. pylori* en la membrana basal lo que sucedió al 7º día. Los 60 restantes infectados fueron divididos en tres grupos a los cuales se les administró el siguiente esquema de tratamiento:

Cuadro 4 : Esquema de Tratamiento

Grupo	Nº de animales	Dosis mg/ Kg.
Agua Destilada.	20	5 MI
Ranit.+ Claritromicina + Bism.	20	25+7.14+5.70
Ext. Flu. <i>Buddleia globosa</i>	20	50

El tiempo de administración fue de 15 días consecutivos, al término de los cuales se procedió a sacrificarlos con Pentobarbital Sódico: 50 mg/ Kg vía IP, realizándose luego, la laparotomía para la extracción del estómago y su evaluación macro y microscópica.

Una vez obtenido el estómago se fijó mediante formalina neutra al 20% y se realizó los cortes de las zonas de píloro, antro y fundus. Se fijó en parafina y se realizó los cortes en el micrótopo depositándose estos en láminas porta-objetos, para la aplicar la técnica de tinción de Warthin Starry; Donayre M.C.-1993(27). Al término de la fijación se evaluó la presencia de *H. pylori*, se buscó principalmente en las células mucinosas de las glándulas y se observó el microorganismo de color negro en forma de coma o vuelo de gaviotas y en fondo de color amarillo.

4.6. Efecto Del Extracto De *Buddleia Globosa* Sobre La Contracción Inducida Por Acetilcolina E Histamina En La Musculatura Lisa De Íleon De Rata.

4.6.1. Material Biológico

6 ratas Sprague Dawley adultas, de 300-400 g, con restricción de alimentos sólidos 24 h antes del experimento, obtenidas del Bioterio del Instituto de Nutrición del Ministerio de Salud.

4.6.2. Fármacos y reactivos:

Acetilcolina 10^{-2} M, a 10^{-9} M. (Sigma Co. St. Louis.)

Cloruro de Potasio 1.0 M

Histamina 10^{-2} M.

Solución Nutritiva Tyrode.

4.6.3. Equipos e Instrumentos

Equipo de Órganos aislados con una cámara de 20 cc

Quimógrafo Eléctrico modelo 441 (HARVARD APPARATUS Co. Inc. Dover MASS).

Material de Disección

Equipo de Vidriería

4.6.4. Procedimiento:

Se disecó segmentos intestinales de 2 cm de longitud de íleon de ratas previamente sacrificadas por trauma cefálico. Los tejidos aislados fueron limpiados y suspendidos verticalmente en la cámara del sistema de órganos aislados con la solución nutritiva Tyrode. El sistema fue mantenido a una temperatura de 37° C y aireada continuamente, pH =7,4. Se permitió la estabilización de la preparación por 30 minutos y se procedió a administrar los fármacos y el extracto de *Buddleia globosa* realizándose los registros de la actividad contráctil con un sistema isotónico.

En el caso de los experimentos con Acetilcolina (n = 4), se agregó 2 concentraciones consecutivas de ACh 10^{-4} M, con un intervalo de 5 minutos, previo lavado entre ambas dosis. Al alcanzarse la máxima intensidad en la segunda contracción se administró inmediatamente 0,2 mL de la Solución de Extracto de *Buddleia globosa*. Se registro y comparo ambas contracciones, en presencia y ausencia de *Buddleia globosa*.

Se realizó el estudio de la curva dosis - respuesta (n = 4) para evaluar el comportamiento de agonista o antagonista frente a la sustancia patrón de Acetilcolina adicionando concentraciones desde 10^{-9} a 10^{-5} M.

En el caso de los experimentos con Histamina (n = 4) se agregó 1 concentración de Histamina 10^{-4} M la cual indujo una contracción bifásica con un componente inicial fásico y un segundo tónico. Al alcanzar un patrón estable la fase tónica de contracción se agregó 0,2 mL de la Solución de Extracto de *Buddleia globosa*. Se registró y comparó el nivel de contracción tónica en presencia y ausencia de *Buddleia globosa*.

V. RESULTADOS

5.0.- ESTUDIO BOTÁNICO DE *Buddleia globosa*.

5.1. Estudio Histológico de la *Buddleia globosa*.

En los estudios histológicos de la planta fresca de *B. globosa*, se realizó los cortes tanto de la hoja como del tallo y la descripción detallada por microscopía de luz:

1.- Descripción de los tejidos

Tallo : Sección transversal

Epidermis: con presencia de tricomas del tipo ramificado ramificado.

- Colénquima :
aproximadamente del tipo lagunar, formando una capa delgada debajo de la epidermis.

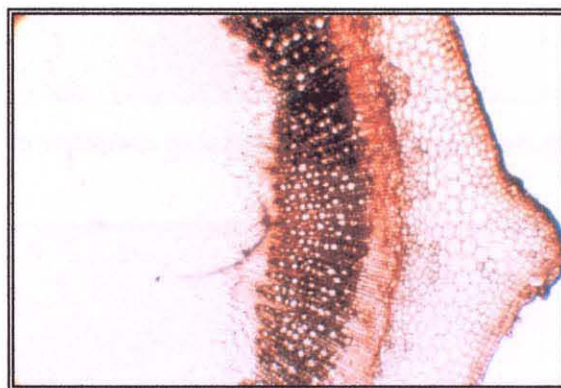


Figura 5.1.1. Microfotografía de la Sección transversal del tallo.

Corteza :

Parénquima cortical

Fibras esclerenquimáticas

Floema secundario

Cambium vascular

- Xilema secundario
- Médula : con parénquima medular

Tallo : Sección longitudinal: Vasos xilemáticos de tipo: espiralado, anillado, y reticulado.

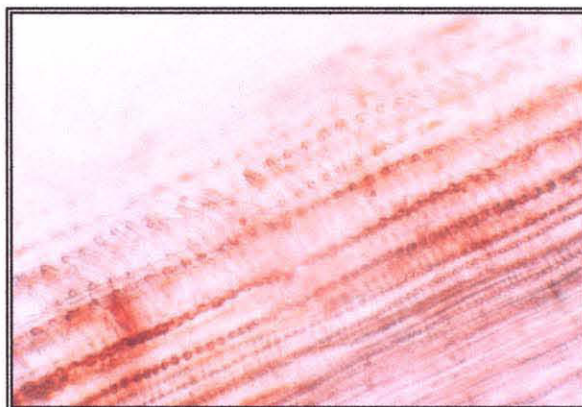
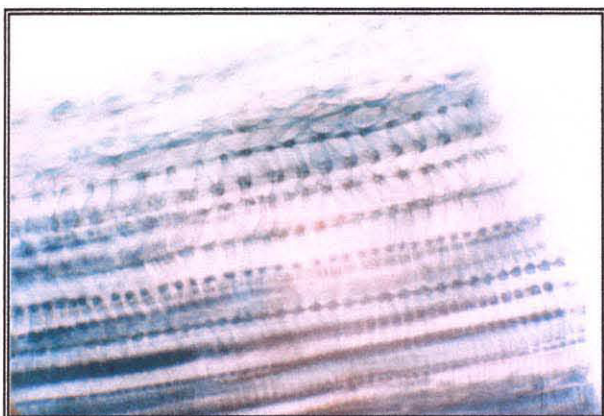


Figura 5.1.2 : Microfotografías de la Sección longitudinal del tallo en la Tinción de Lugol y de Azul de Metileno fijadas para microscopía.

Hoja : Sección transversal

- Epidermis adaxial Mesófilo
- Parénquima en empalizada (3 capas).
- Parénquima lagunar.
- Epidermis abaxial : con tricomas de tipo ramificados y de tipo alado



Figura 5.1.3. Microfotografía de la Sección transversal de la hoja

Hoja: Sección superficial

- Superficie adaxial
 - Estomas en baja densidad
 - Células de contorno poligonal
 - Excrecencia en determinadas células con apariencia de bolsa oleífera

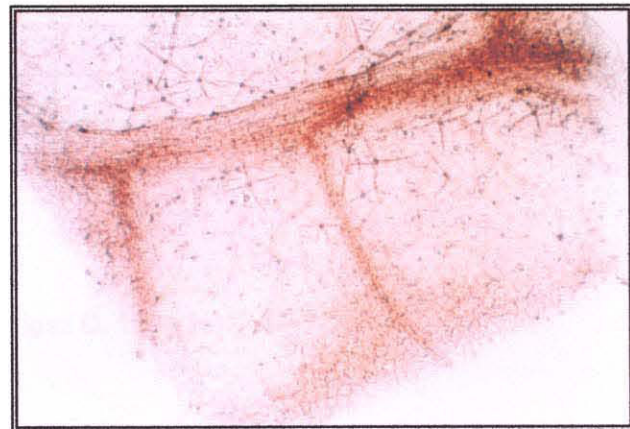


Figura 5.1.4. Microfotografía de la Sección superficial de la hoja

Superficie abaxial

- Estomas de alta densidad y tricomas de tipo ramificado y de tipo alado.

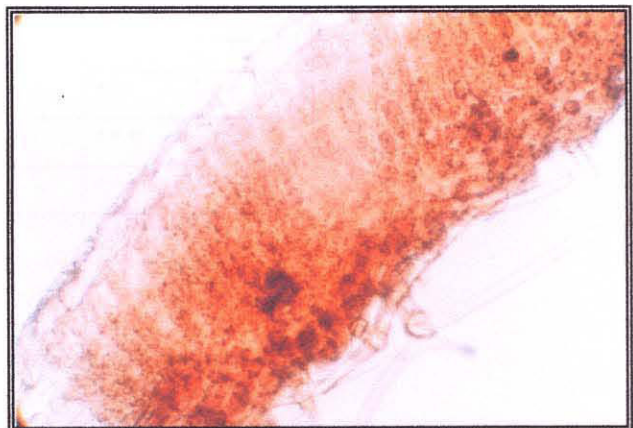


Figura 5.1.5. Microfotografía de la Sección abaxial de la hoja

5.2. RESULTADOS DEL ESTUDIO FOTOQUÍMICO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *BUDDLEIA GLOBOSA*.

5.2.1. Estudio de Solubilidad: Domínguez X 1985 (24)

Cuadro N° 5.

SOLVENTES	HOJA	TALLO
AGUA	+	+
METANOL	++	++
ETANOL	+++	+++
ACETONA	+++	+++
ACETATO ETILO	+++	+++
CLOROFORMO	+++	+++
N-HEXANO	++	++
ÉTER ETÍLICO	+	+
BENCENO	+	+

5.2.2. MARCHA FITOQUÍMICA: Lock de Ugaz O. 1994(25).

Cuadro 6 : Identificación de los principales grupos del Extracto Etanólico de *B. globosa*:

Reactivos	GRUPO FUNCIONAL	Hoja	Tallo
FeCl ₃	(com. Fenólicos)	+++	+++
Dragendorff	(Alcaloides)	++	++
Shinoda	(Flavonoides)	+++	+++
Sol. Gelatina	(Taninos)	+++	+++
Mayer	(Alcaloides)	++	++
Molish	(Azúcares o glucósidos)	+	+

Leyenda: + = Poca presencia

++= Moderada.

+++ = Abundante

El estudio con los diferentes reveladores para la identificación de los grupos reactivos mostró la presencia de: Flavonoides, compuestos fenólicos, azúcares de glucósidos y alcaloides utilizándose para estas determinaciones reactivos químicos como físicos Lock De Ugaz ,1988; 1994. (25)

Cuadro 7 : Identificación de los principales grupos del Extracto Etanólico de *B. globosa* en la marcha fotoquímica.:

Reveladores	Compuestos En El Tallo			Compuestos en las Hojas		
Luz UV 366nm	Fenoles +++	Flavonoides +++	Alcaloide +	Fenoles +++	Flavonoides ++	Alcaloides -
H ₂ SO ₄ Conc.	+++	+++		+++	++	-
Vapores de Amoniaco	+++	+++		+++	++	-
Dragendorff			++			+
Sol. Alcohólica de Fe Cl ₃ 1%	+++	+++		+++	+++	

Leyenda: + = Poca presencia

 ++= Moderada.

 +++= Abundante

Cuadro N° 8 : "Fraccionamiento del extracto etanólico de *B. Globosa* por cromatografía en columna Rápida".

Solventes	N-Hexano.		Cloroformo.		Metanólico		Agua	
Reactivos de Identificación	Hoja	Tallo	Hoja	Tallo	Hoja	Tallo	Hoja	Tallo
Fe Cl ₃ 1%	+	+	++	++	+++	+++	++	+++
Shinoda	+	+	++	++	+++	+++	++	+++
Dragendorff	++	++	++	+++	+	+	+	+
Hidroxilamina	+	+	+	+	+	+	+	+

Leyenda: + = Poca presencia

 ++= Moderada.

 +++= Abundante

Para realizar el estudio de las separaciones cromatográficas en capa fina se utilizaron diferentes sistemas de solventes de acuerdo a su polaridad. Se empleó Cloroformo y Metanol en diferentes proporciones, eligiendo aquellos de mayor resolución en el revelado del cromatograma Bruneton J. 1995(26); Dominguez X 1985 (24).

Después del análisis cromatográfico y las continuas purificaciones del sub-extracto metanólico en cromatografía en columna con un total de 102 fracciones y luego de ser sometidas a purificación en cromatografía en capa fina, se aislaron 6 fracciones.

Cuadro N° 9 : Identificación de los compuestos aislados mediante los diferentes sistemas de cromatografía

	Comp. F1	Comp. F2	Comp. F3	Comp. F4	Comp. F5	Comp. F6
Crom. En capa Fina.	Cloroformo - Metanol 25 : 1	Cloroformo - Metanol 50 : 1	Cloroformo - Metanol 50 : 1	Cloroformo - Metanol 50 : 1	Cloroformo - Metanol 70 : 20	Acetato Etilo - Ac. Fórmico - Agua 75:15:10
Rf	0.94	0.16	0.19	0.30	0.80	0.87
Luz UV 366 nm	CELESTE PÚRPURA	ROJO PÚRPURA	PÚRPURA	PÚRPURA	CELESTE	ROJO PÚRPURA
Luz Vis.	AMARILLO	AMARILLO	PÚRPURA	PÚRPURA	AMARILLO	AMARILLO

Separadas e identificadas las fracciones se realizó la identificación de las misma por el método de espectrofotometría U.V., y se llevó a cabo las reacciones de desplazamiento para la identificación de los grupos involucrados en la estructura de los compuestos, se evidenció los diferentes espectros iniciales sin reactivos y las modificaciones de estos en las longitudes de onda máximas de absorción en los diferentes experimentos utilizando los reactivos clásicos de desplazamiento: Tricloruro de Aluminio, Ácido sulfúrico, Metóxido de Sodio y Ácido Bórico. Mabry 1970(27)

A continuación se presenta los siguientes resultados:

Fracción Número 1: Picos de Máxima absorbancia en el Espectro UV – Fracción 1

Cuadro 10: Identificación al Espectrofotómetro ULTRAVIOLETA, de las Fracciones purificadas.

Pico Número	Longitud de onda nm	Absorción
1	292	2.068207
2	312	2.153732

Se desarrollaron las reacciones de desplazamiento, para verificación de radicales: con Metóxido de Sodio, Tricloruro de Aluminio, Ácido Sulfúrico. Mabry J. Markham K 1970 (27)

Figura 1: Se muestra la Fracción 1, purificada y evaluada a espectrofotometría ultravioleta.

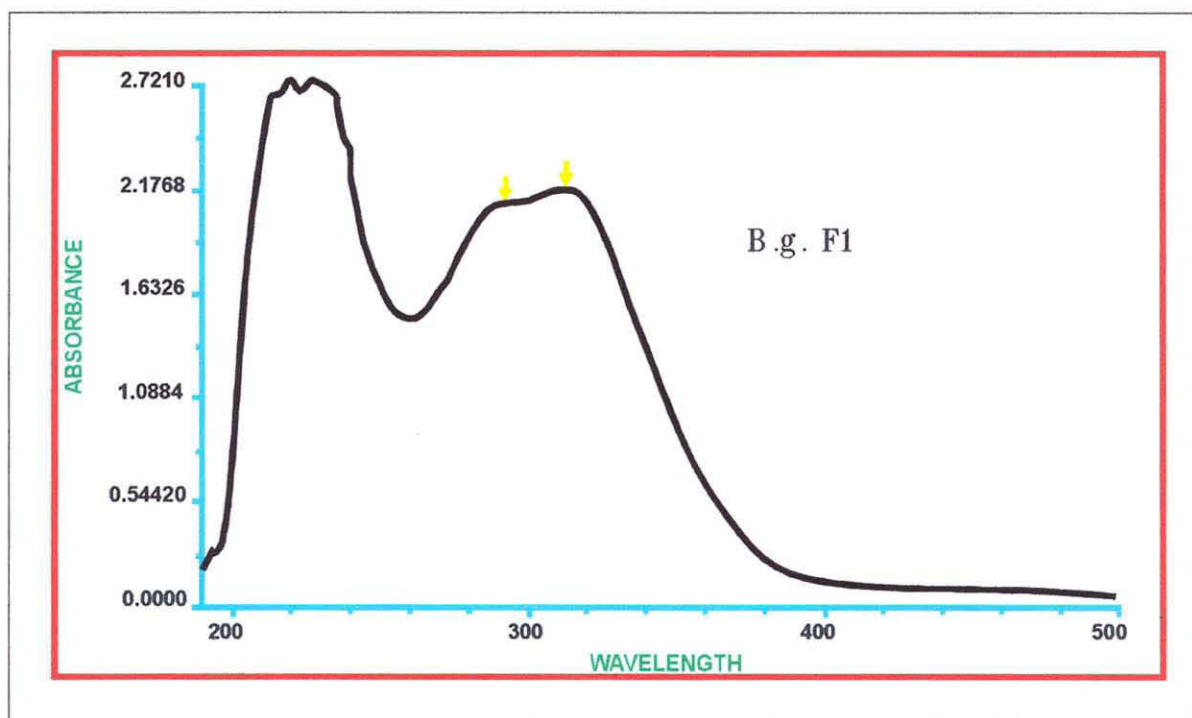


Figura 1.1 : Fracción 1, purificada con reacción de desplazamiento empleando Metóxido de Sodio y evaluada a espectrofotometría ultravioleta.

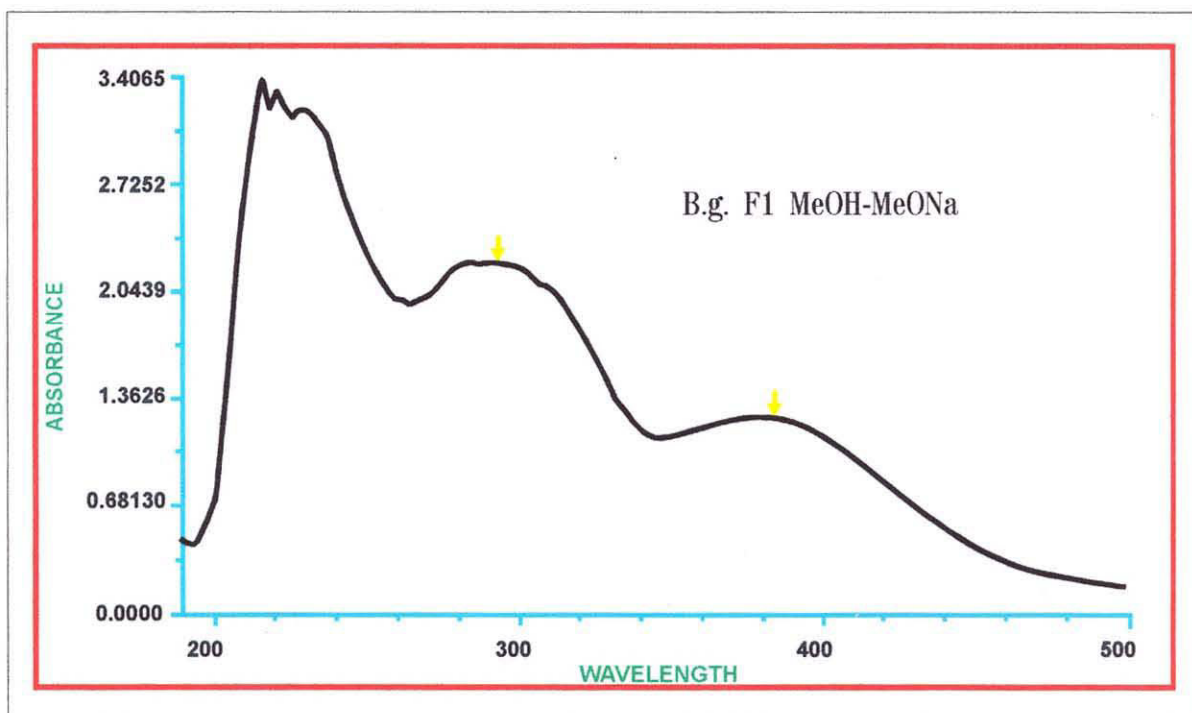
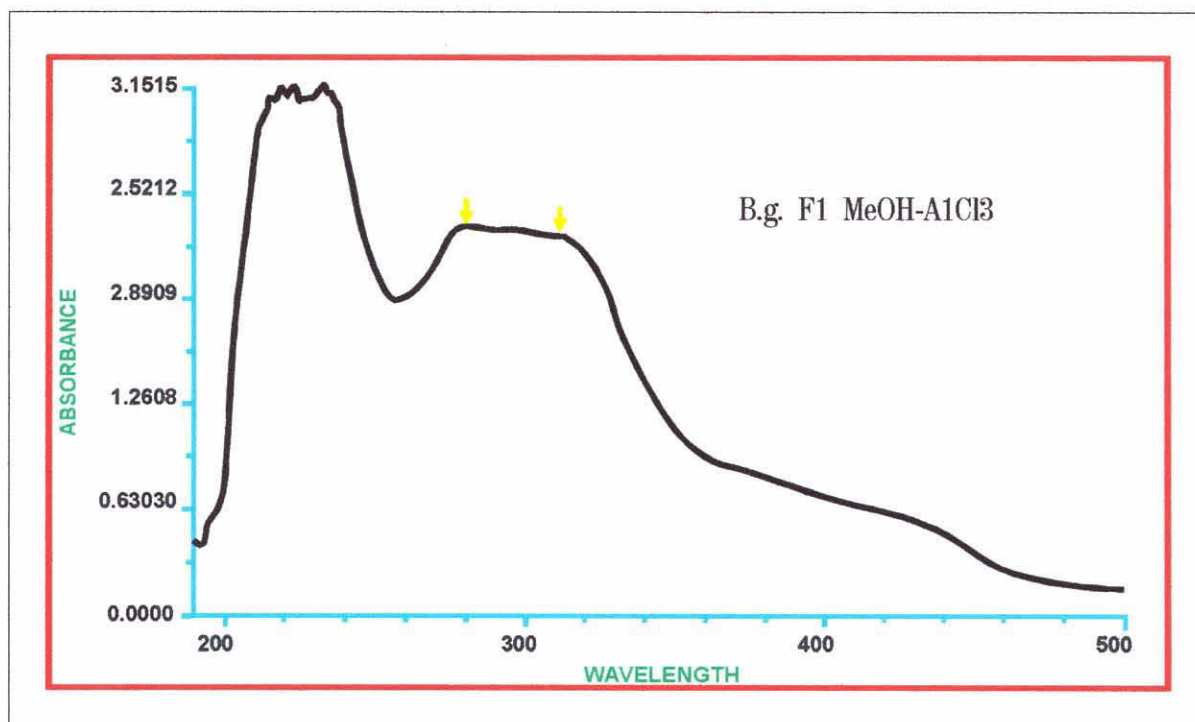
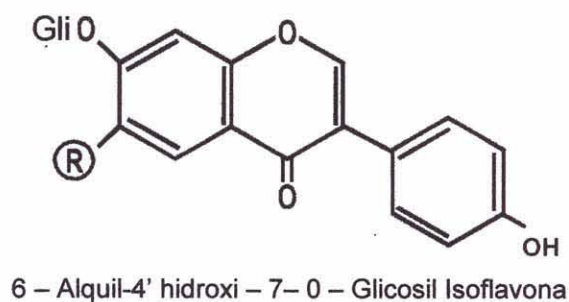


Figura 1.2. Fracción 1, purificada con reacción de desplazamiento empleando Tricloruro de Aluminio y evaluada a espectrofotometría ultravioleta. Mabry T. J. 1970(27).



De la interpretación de estos resultados se deduce la siguiente fórmula:



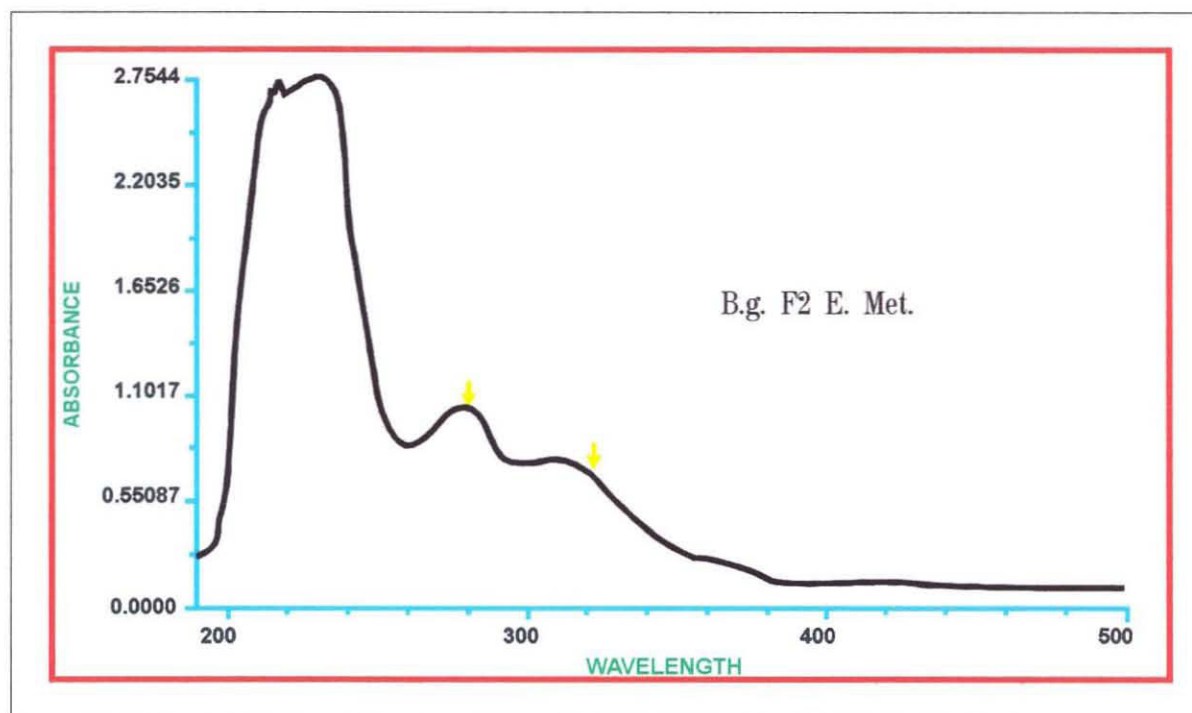
De la fracción Número 2: se muestra los picos de Máxima absorbancia en el Espectro UV .

Cuadro 11: Identificación al Espectrofotómetro ULTRAVIOLETA, de las Fracciones purificadas.

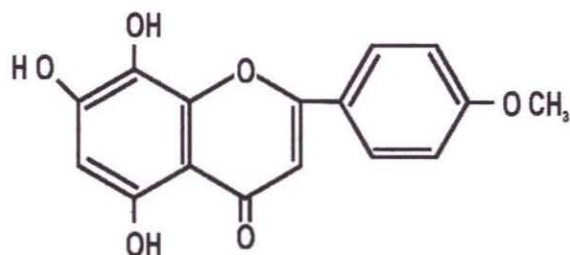
Pico Número	Longitud de Onda nm	Absorción
1	280	1.009506
2	322	0.663010

Se realizaron los estudios de desplazamiento, con los reactivos Metóxido de Sodio, Tricloruro de Aluminio, Ácido Sulfúrico

Figura 2 : Fracción 2, purificada y evaluada a espectrofotometría ultravioleta.



En la interpretación de las reacciones de desplazamiento y de acuerdo a la literatura consultada se ha desarrollado la siguiente estructura:



5,7,8 – Trihidroxi – 4' – O – Metil Flavona

De la Fracción Número 3: se muestra los Picos de Máxima absorbancia en el Espectro UV

Cuadro 12: Identificación al Espectrofotómetro ULTRAVIOLETA, de las Fracciones purificadas.

Pico Número	Longitud de Onda	Absorción
1	278	0.870926
2	312	0.5785568

Se realizaron los estudios de desplazamiento y verificación de los radicales en el núcleo.
Con los reactivos de Metóxido de Sodio, Tricloruro de Fierro, Ácido Sulfúrico.

Figura 3: Fracción 3 purificada y evaluada a espectrofotometría ultravioleta.

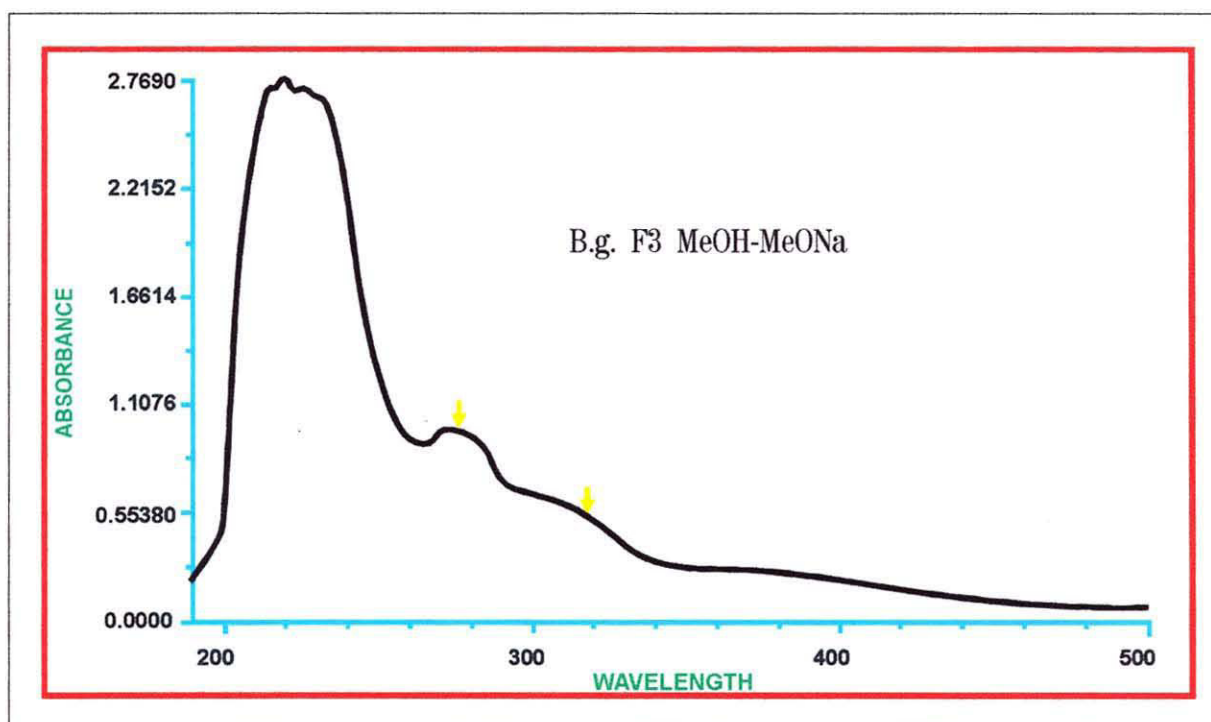
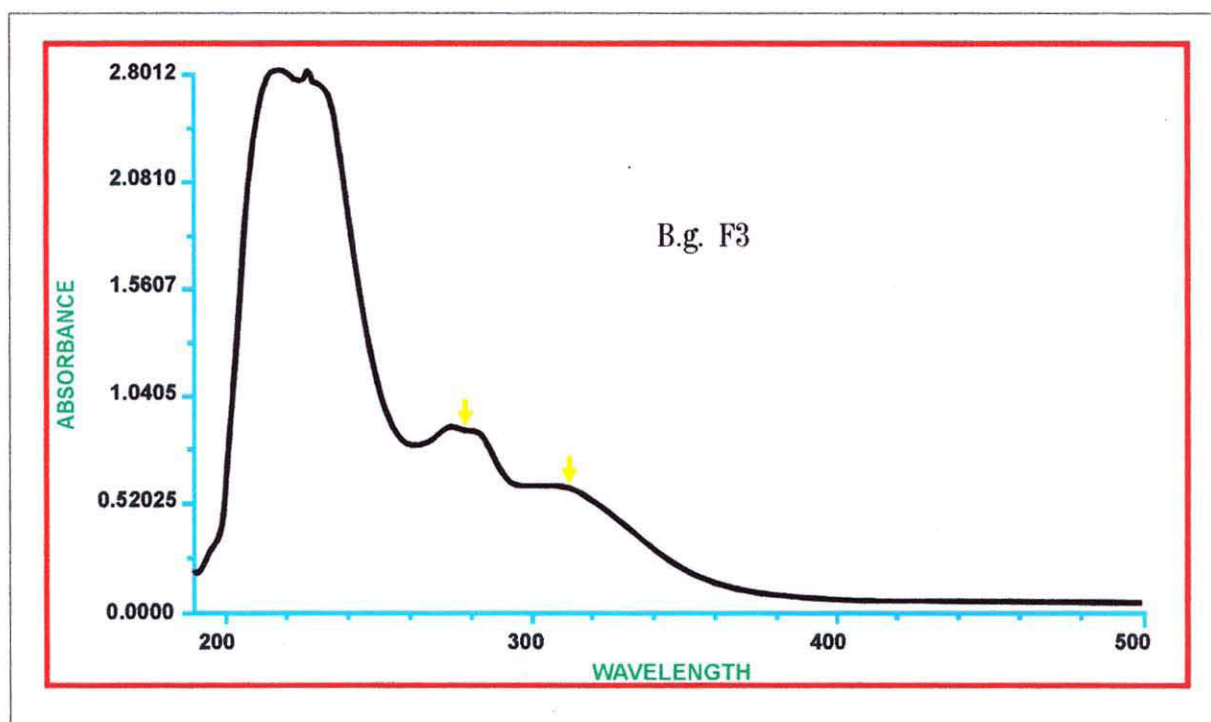
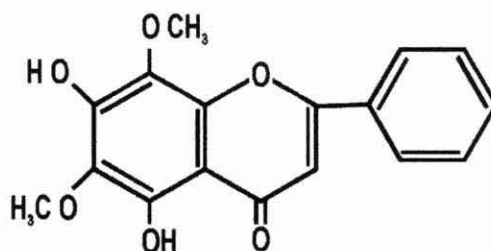


Figura 3.1 : Fracción 3, purificada con reacción de desplazamiento empleando Metóxido de Sodio y evaluada a espectrofotometría ultravioleta.



De la interpretación de estas reacciones se ha estructurado la siguiente fórmula:



5,7 – Dihidroxi – 6,8 – dio–Metil Flavona

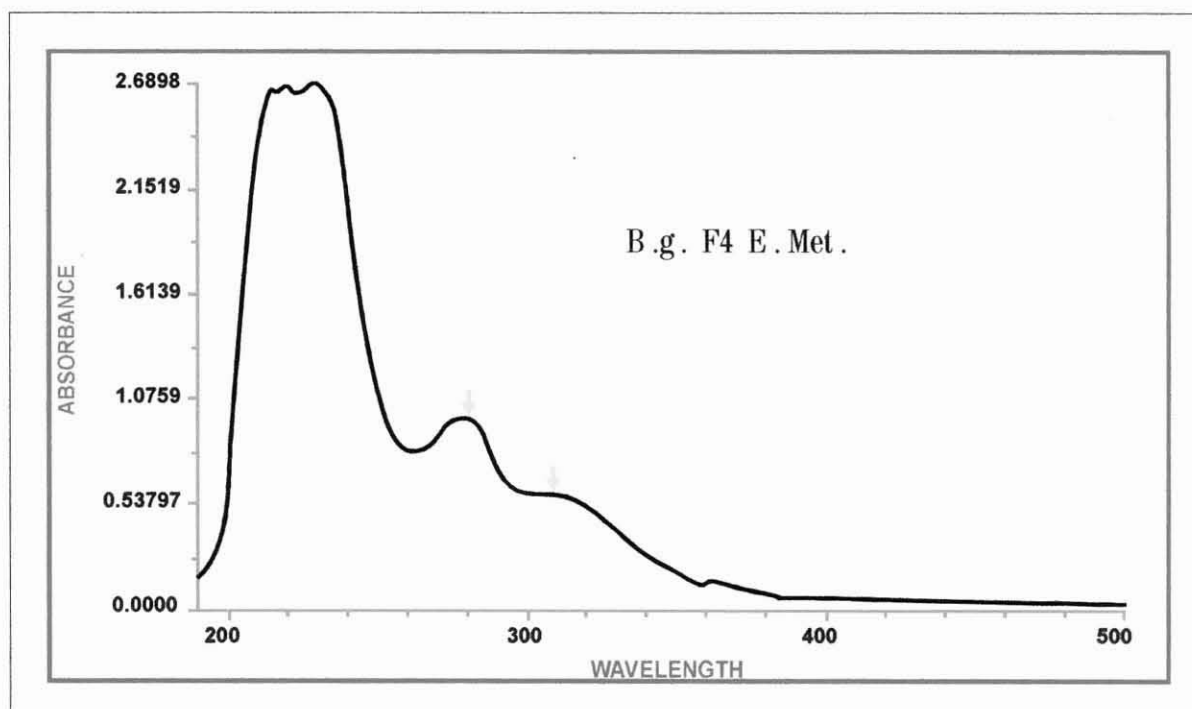
De la Fracción Número 4: se muestra los picos de Máxima absorbancia en el Espectro UV

Cuadro 13: Identificación al Espectrofotómetro ULTRAVIOLETA, de las Fracciones purificadas.

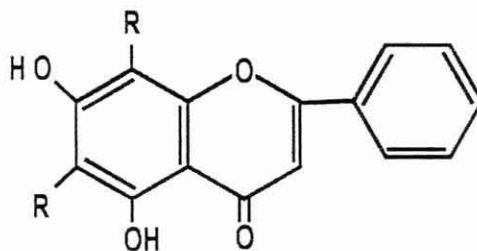
Pico Número	Longitud de Onda nm	Absorción
1	280	0.967300
2	308	0.573959

Se realizaron los estudios de desplazamiento y verificación de los radicales en el núcleo, con los reactivos de Metóxido de Sodio, Tricloruro de Aluminio, Ácido Sulfúrico.

Figura 4. Fracción 4 purificada y con reacción de desplazamiento empleando Metóxido de Sodio y evaluada a espectrofotometría ultravioleta.



De acuerdo a la interpretación de los resultados encontrados se muestra la siguiente fórmula que corresponde a la fracción 4.



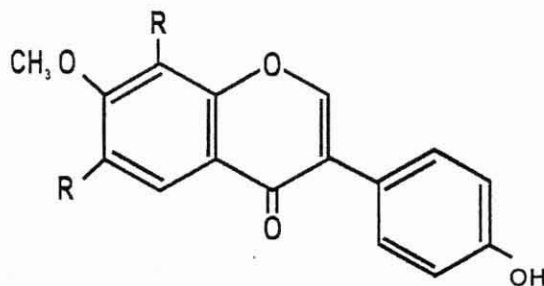
5,7 – Dihidroxi – 6,8 – Dialquil Flavona

De la fracción Número 5: se muestra los picos de Máxima absorbancia en el Espectro UV .

Cuadro 14: Identificación al Espectrofotómetro ULTRAVIOLETA, de las Fracciones purificadas.

Pico Número	Longitud de Onda nm	Absorción
1	274	0.9378
2	290	0.312

La Fracción 5 purificada y con reacción de desplazamiento empleando Metóxido de Sodio y evaluada a espectrofotometría ultravioleta. De la interpretación de estos resultados se deduce la siguiente fórmula:



6,8 – dialquil – 4' – hidroxi – 7 – O – Metil Isoflavona

5.3 Resultados De La Evaluación Antimicrobiana Del Extracto Fluido De *Buddleia globosa*: Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)

El estudio de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico fluido de *B. globosa* frente a las diferentes cepas de microorganismos patógenos y comparados con otros antimicrobianos estándares de actividad conocida mostró efectividad contra *Helicobacter pylori* cepa nativa, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

Cuadro 15 : Evaluación del MIC del extracto de fluido de *Buddleia globosa*

CEPAS Dilución	Extracto Etanólico de <i>B. Globosa</i> (mg/dl.)	Amoxicilina (mg/dl.)	Amoxicilina / Ac. Clavulánico (mg/dl.)	Trimetropim/ Sulfametoxazole (mg/dl.)
<i>Helicobacter pylori</i> 10 ⁶ UFC/MI	0.5	0.06	0.06	1
<i>Helicobacter pylori</i> 10 ⁵ UFC/mL	0.25	0.06	0.06	1
<i>Escherichia coli.</i> ATCC 25922 10 ⁶ UFC/mL	0.5	1	1	0.5
<i>Escherichia coli.</i> ATCC 25922 10 ⁵ UFC/mL	0.25	1	0.5	0.5
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 10 ⁶ UFC/ mL	0.5	8	0.25	1
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 10 ⁵ UFC/mL	0.25	4	0.125	0.5

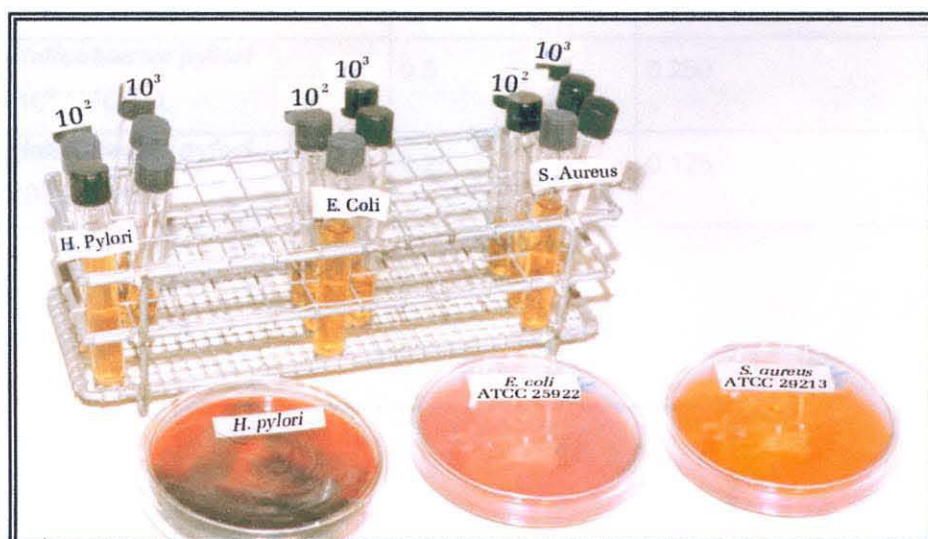


Figura 5.3 Placas de cultivo de las cepas utilizadas para realizar la efectividad antimicrobiana del Extracto Etanólico de *B. globosa*. Cepas ATCC 29213 de *Staphylococcus aureus*. Cepas ATCC 25922 de *Escherichia coli*. Cepas de *Helicobacter pylori* nativas.

Cuadro 16 : Rango normal de las concentraciones para la actividad mínima inhibitoria MIC (mcg/mL).

ANTIBIÓTICO	Cepa <i>S. aureus</i> ATCC 29213	Cepa <i>E. Coli</i> ATCC 25922
Amoxicilina (mcg/mL)	4 – 32	1 – 4
Amoxicilina/Ac.Clavulánico	-----	0.5 – 2
Trimetropim/ Sulfametoxazole	< 0.5 - 2	< 0.5 – 2

En el estudio de la efectividad antibacteriana frente a *H. pylori* se usó cepas nativas a las cuales se realizó la caracterización bioquímica de la prueba de ureasa para confirmar su actividad lo que se muestra en la foto N° 9. Así mismo se utilizó diferentes diluciones del Extracto Etanólico para comprobar la actividad bactericida y bacteriostática frente a este microorganismo y se presenta en el siguiente cuadro.

CEPA NATIVA	BACTERICIDA (mg/dl.)	BACTERIOSTATICA (mg/dl.)
<i>Helicobacter pylori</i> 10 ⁶ UFC/ mL	0.5	0.250
<i>Helicobacter pylori</i> 10 ⁵ UFC/mL	0.25	0.125



Figura 5.3.1 Prueba Positiva para la Ureasa para *Helicobacter pylori*.

5.4. RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS FARMACOLÓGICOS

5.4.1. Bioensayo de Toxicidad en *Artemia salina* Concentración Letal₅₀.

En el Bioensayo con *Artemia salina* se han empleado diluciones del extracto etanólico de *B. globosa* desde: 1, 3, 10, 30, 100, 300 hasta 1000 ppm.

Resultados :

La Concentración Letal₅₀ obtenida en esta metodología se determinó en :

CL₅₀..... 300 ppm.

5.4.2. Dosis Letal 50

Resultados:

En ninguno de los grupos de los 50 ratones Cepa CF-1 hubo muerte alguna, empleándose dosis desde 10 mg/Kg., hasta 2000 mg/Kg evaluados durante 72 horas. De estos resultados podemos concluir que el extracto fluido de *Buddleia globosa* es inocuo en los ensayos de toxicidad aguda y carece de efectos tóxicos en estos animales de experimentación en estas condiciones experimentales.

5.5. Resultados de los modelos experimentales de inducción ulcerativa.

5.5.1.Efecto del Extracto Etanólico de *Buddleia globosa* (200 mg/Kg., Vía intragástrica) en úlcera inducidas por Estrés de Inmovilización y Frío en ratas. Senay E.C. Levin R.J.

En el modelo experimental de inducción ulcerativa de Senay E.C. Levin R.J. (10,11) desarrollado en este trabajo nos mostró la efectividad del estrés por frío e inmovilización en la producción de úlceras en el grupo control, así como el efecto antiulceroso que presentan el Extracto Etanólico de *B. globosa* y la Ranitidina en la disminución significativa ($p < 0.05$) al tratamiento de estos datos.

Cuadro N° 18 Resultados del efecto antiulceroso del Extracto Etanólico de *B. globosa* y Ranitidina en las ratas sometidas a estrés de frío e inmovilización frente al control (agua destilada).

	Control	Extracto Etanólico de <i>B. globosa</i> (200 mg/ Kg.)	Ranitidina (100 mg/ Kg.)
Número de Úlceras (X)	6.63 ± 4.041	1.45 ± 1.58*	0.7 ± 1.12*
Area total (mm ²)	1.78 ± 1.23	0.44 ± 0.49	0.25 ± 0.40
Escala de Marhuenda	1.5	0.4	0.2
Número de ratas ¹	19	10	10

En el cuadro se puede apreciar la disminución estadísticamente significativa del Promedio de úlceras en el grupo que recibe Ranitidina (100 mg/Kg) y el Extracto Etanólico de *B. globosa*.

¹ El peso promedio de los animales fue de 300 ± 50 g.

* Cifra significativa ($p < 0.05$)

El cuadro N° 19 : Efecto en Porcentaje de Inhibición de ulceración

% de inhibición IUc-IUp / IUc x 100	
<i>B. globosa</i> (200 mg/ Kg)	85.71
Ranitidina (100 mg/ Kg)	92.85

Resultado de los grupos de Ranitidina y *B. globosa* existe una diferencia estadísticamente considerable con respecto al control de 92.85% y 85.71 % de inhibición ulcerosa.

5.5.1. Efecto del Extracto Etanólico de *Buddleia globosa* (200 mg/Kg., Vía intragástrica) en úlcera inducidas por Estrés Quirúrgico de Ligadura de píloro e inmovilización. CYTED (15)

En los resultados que se muestran se puede apreciar una disminución significativa 62.19 % ($p < 0,05$) del volumen del contenido gástrico con respecto al control, así como un incremento significativo en el pH de $2,43 \pm 0,71$ ($p < 0,05$) expresado en la disminución de la concentración de protones a $3,7 \times 10^{-3}$ M. Igualmente en esta tabla se aprecian los resultados obtenidos en el grupo que se le administró Ranitidina, donde se observó, una disminución significativa ($p < 0.05$) del contenido gástrico de 45.33% mientras que el pH 2.31 ± 0.46 mostró un aumento significativo ($p < 0.05$) respecto al control. Con respecto al grupo que se le administró Subsalicilato de Bismuto se observó una disminución del volumen de secreción gástrica del 40% con respecto al Control y no existe diferencia significativa en la variación de pH.

Cuadro N° 20 : Resultados del Efecto del Extracto Etanólico de *B. globosa*, Ranitidina y Subsalicilato de Bismuto en animales sometidos a inducción ulcerativa por Estrés Quirúrgico de Ligadura de píloro e inmovilización.

Análisis del Contenido Gástrico	Grupo Control (Agua dest.)	Extracto Etanólico de <i>B. globosa</i> (200 mg/Kg)	Ranitidina (100 mg/Kg)	Subsalicilato de Bismuto (5.71 mg/Kg)
Nº de animales ¹	10	10	10	10
Volumen (mL)	10.05 ± 1.54	3.97 ± 1.19	5.74 ± 1.43	6.20 ± 0.87
PH	2.00 ± 0.28	2.43 ± 0.71	2.31 ± 0.46	1.84 ± 0.25
Glucosa (mM/L)	0.30 ± 0.23	0.31 ± 0.22	0.32 ± 0.18	0.05 ± 0.03
Proteínas (g/L)	6.71 ± 2.95	8.44 ± 3.16	5.94 ± 2.03	4.75 ± 2.66
Albumina (g/L)	1.04 ± 0.54	0.44 ± 0.34	0.32 ± 0.19	0.16 ± 0.16
Globulina (g/L)	5.92 ± 2.87	7.73 ± 3.10	5.77 ± 2.10	4.60 ± 0.16
Sodio (mEq/L)	140 ± 0.00	132.89 ± 21.33	127.5 ± 20.50	131.8 ± 24.18
Potasio (mEq/L)	8.70 ± 2.82	8.54 ± 2.17	7.37 ± 3.02	7.31 ± 3.84
Cloro (mEq/L)	65.85 ± 18.16	83.28 ± 14.80	67.88 ± 12.21	46.5 ± 32.58
[Molar de H ⁺]	1 x 10 ⁻²	3.7 x 10 ⁻³	4.8 x 10 ⁻³	1.5 x 10 ⁻²

*¹ El peso promedio de las ratas fue 250 ± 25 gramos.

En la evaluación macroscópica del estómago de los ratas en estudio se evidenció la aparición de úlceras en las diferentes zonas de la mucosa: antro, fundus y píloro. A continuación se presenta los resultados de los diferentes tratamientos en el siguiente cuadro.

Cuadro N° 21: Resultado De La Determinación Y Evaluación Macroscópica De La Mucosa Gástrica De Los Animales Sometidos A Estrés Quirúrgico De Ligadura De Píloro E Inmovilización.

Tratamiento	Número Animales	Número de úlceras	Región gástrica Cuerpo	Región gástrica Antro pilórica	Región gástrica fundus	Area Total (mm ²)	Indice de Inhibición %
Grupo: Agua destilada.	10	40	24	15	01	52.5	00%
Grupo: Ranitidina	10	18	8	6	4	24	54.28
Grupo: E F M. <i>B. globosa</i>	10	15	7	5	3	22	58.09
Grupo: Subsalicilato de Bismuto	10	20	14	6	00	30	42.85

Se puede apreciar que el mayor porcentaje de Inhibición de la acción ulcerativa provocada por el estrés quirúrgico es de 58.09% para EF *B. globosa* y para Ranitidina de 54.28%, no así lo muestra el Subsalicilato de Bismuto que presenta el 42.85% esto está referido al Control.

5.5.2. Modelo experimental de inducción ulcerativa en animales de experimentación con administración de inóculo de *Helicobacter pylori* 10⁵ UFC x mL.

Grupos: ¹ CONTROL: Agua destilada Vía Intra gástrica: 5 mL/Kg por 15 días.

² Extracto Etanólico de *B. globosa* 50 mg/ Kg por 15 días.

³ Dosis de tratamiento Claritromicina: 7.14 mg/ Kg.+ Subsalicilato de Bismuto 5.71+ Ranitidina : 25 mg/ Kg.

Tiempo de Tratamiento: 15 días.

Resultados: Observación Microscópica de la región antro pilórica de los animales en estudio

Cuadro 22 : Observaciones Macroscópicas De Estómagos De Animales De Experimentación Sometidos A Infección Por Inoculación De *Helicobacter Pylori*

Tratamiento	Agua destilada ¹	Extracto Etanólico <i>B. globosa</i> ²	Ranitidina + Claritromicina + Bismuto ³
Características de la mucosa gástrica			
Color rosado	1	14	8
Color pálido	1	6	12
Color rojo	18	0	0
Aspecto hiperhémico	3	8	16
Aspecto congestivo	17	0	4
Pliegues Normales	1	12	4
Pliegues hipertróficos	19	8	16
Presencia de <i>H. Pylori</i>	19	8	6
Ausencia de <i>H. Pylori</i>	1	12	14
Número de animales	20	20	20

Al estudio microscópico de la región antro pilórica de los cortes se evidenció que en :

Grupo: ¹**Agua destilada;** Mucosas del estómago 85% de estos congestivas , 15% hiperémicas, el 95% con pliegues hipertróficos, en así también el 90 % de los animales presenta *Helicobacter pylori*

²*B. globosa;* Mucosas del estómago 60% de los animales conservan la normalidad y se correlacionan con la normalidad de los pliegues. Sólo el 40% muestran hiperemia y con pliegues hipertrofiados. En el 40% mostró la presencia de *Helicobacter pylori*

³Ranitidina+ Claritromicina+Bismuto; Mucosas del estómago el 80% están hiperémicas y con pliegues hipertróficos. El 20% de los animales se encuentran en estado normal. El 30% mostró la presencia de *Helicobacter pylori* de forma cocobacilares.

5.5.2.1 Descripción Del Estudio Anatomopatológico De Los Animales Infectados Con *Helicobacter pylori* Y Sometidos A Los Tratamientos Farmacológicos.

Grupo Control: Agua destilada. (n = 20)

Corte histológico de la región antral, tinción Fuccina – Eosina y de Tinción de Plata.(n = 18)

1. Descripción Macroscópica: Mucosa Congestiva, con pliegues Hiperhémicos:
2. Descripción Microscópica: Gastritis antral severa con actividad elevada a nivel de tejido mucoso, atrofia glandular inicial. Daño mucinógeno parcial multifocal.
3. **Presencia de *Helicobacter pylori* +++**(90% de los tejidos observados, cúmulos densos de H.pylori).
4. Respuesta Inflamatoria: presente con leucocitos polimorfonucleares / +++.

Corte histológico de la región antral, tinción Fuccina – Eosina y de Tinción de Plata.(n = 2)

1. Descripción Macroscópica: Mucosa Congestiva con pliegues ligeramente hipertrofos.
2. Gastritis antral moderada con actividad moderada a nivel del tejido mucoso , atrofia glandular escasa, daño mucinógeno leve moderado.
3. **Presencia de *Helicobacter pylori* ++.**
4. Respuesta inflamatoria: presente con leucocitos polimorfonucleares / ++.

Grupo : B. globosa (n = 20)

Corte histológico de la región antral, tinción Fuccina – Eosina y de Tinción de Plata.(n = 12)

1. Descripción Macroscópica: Mucosa normal y se correlacionan con la normalidad de los pliegues. Sólo el 40% muestran hiperemia y con pliegues hipertrofiados.
2. Descripción Microscópica: Gastritis antral leve a moderada con actividad escasa a nivel de tejido mucoso, atrofia glandular escasa, daño mucinógeno ausente.
3. **Presencia de *Helicobacter pylori* -**
4. Respuesta Inflamatoria: Ausente

Corte histológico de la región antral, tinción Fuccina – Eosina y de Tinción de Plata.(n = 8)

1. Descripción Macroscópica: Mucosa Congestiva con pliegues ligeramente hipertrofos
2. Descripción Microscópica: Tejido gástrico antral con pérdida escasa de citoplasma, atrofia glandular inicial. Daño mucinógeno parcial multifocal.
3. **Presencia de *Helicobacter pylori* +.** Se evidencia asociación de gérmenes cocobacilares
4. Respuesta Inflamatoria: Leve. Leucocitos polimorfonucleares +.

Grupo Patrón Claritromicina+ Ranitidina- Subcittrato de Bismuto: (n = 20)

Corte histológico de la región antral, tinción Fuccina – Eosina y de Tinción de Plata.(n = 14)

1. Descripción Macroscópica: Mucosa Congestiva, con pliegues Hiperhémicos:
2. Descripción Microscópica: Gastritis antral moderada con actividad moderada a nivel del tejido mucoso , atrofia glandular moderada, daño mucinógeno leve a moderado. Daño mucinógeno parcial multifocal.
3. **Presencia de *Helicobacter pylori*** - Negativo
4. Respuesta Inflamatoria: Leve leucocitos polimorfonucleares +

Corte histológico de la región antral, tinción Fuccina – Eosina y de Tinción de Plata.(n = 6)

1. Descripción Macroscópica: Mucosa Congestiva con pliegues ligeramente hipertrofos.
2. Descripción Microscópica: Tejido gástrico con pliegues intracelulares normales, citoplasma celular normal, tejido mucoso escaso
3. **Presencia de *Helicobacter pylori*** +. (Se evidencia asociación de gérmenes cocobacilares)
4. Respuesta inflamatoria: presente con leucocitos polimorfonucleares / +.

5.5.2.2. Resultado De La Evaluación Microscópica De La Mucosa Gástrica: Región Antro Pilórica De Los Animales Inducidos A Ulceración Con Inóculos De *Helicobacter pylori*.

1. Animales Grupo Control

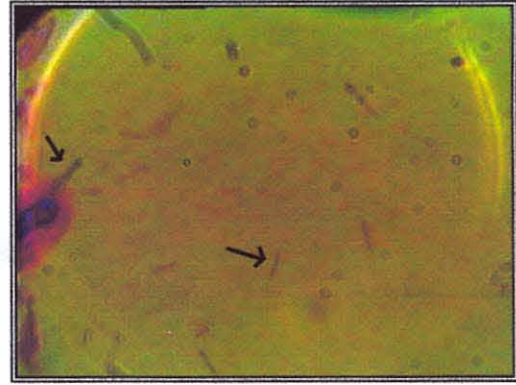
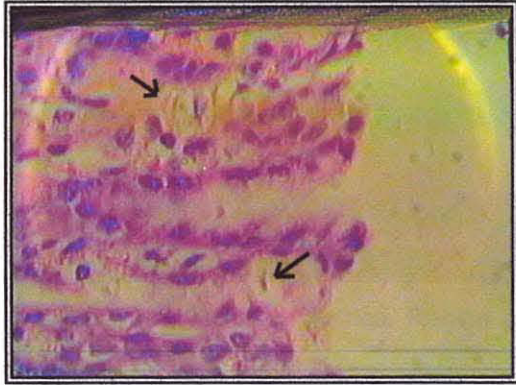


Figura 5.5.2.2.1. Corte histológico región antral, Bacilos de *H. pylori* en el moco gástrico coloración Eosina- Hematoxilina.

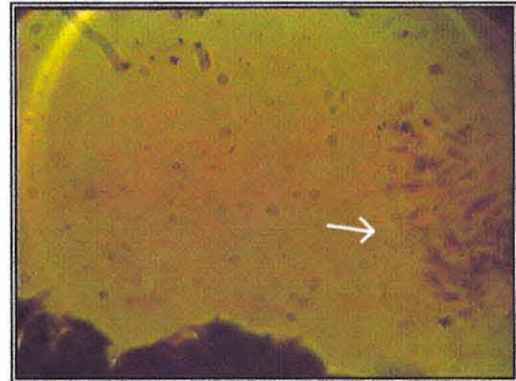
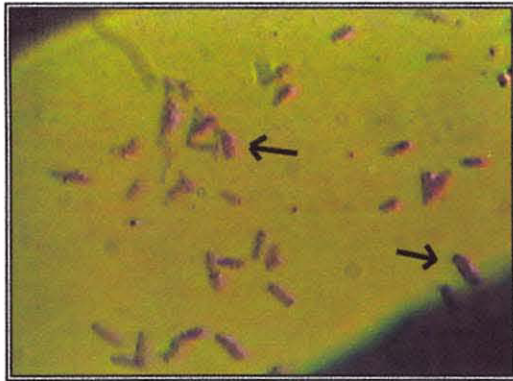


Figura: 5.5.2.2.2. Región del antro, los *Helicobacter pylori*, bacilo entre las células . Coloración Warthin Starry especial para tinción del *H. pylori* . Donayre M.C. 1993 (30)

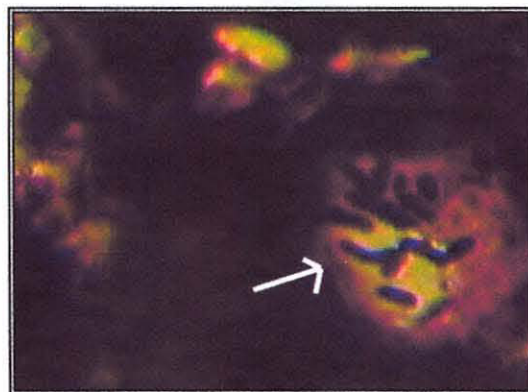


Figura: 5.5.2.2.3. *H. Pylori* en el interior de la mucosa antral, abundantes colonias. Coloración Warthin Starry.

2. Animales Grupo B. globosa.

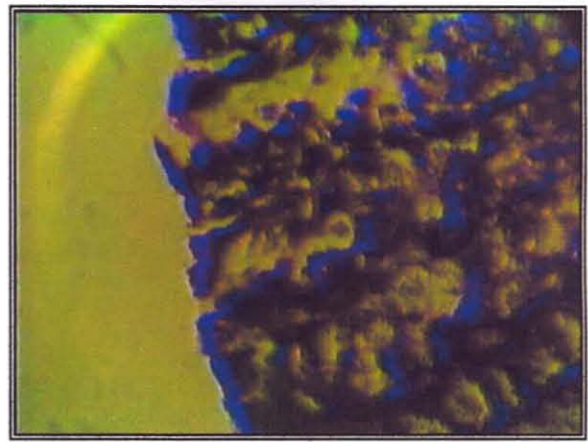
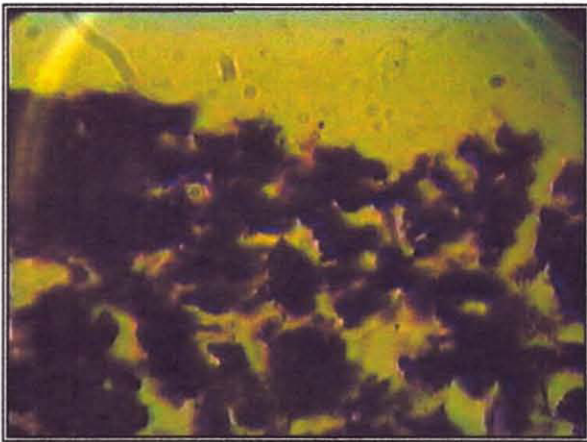


Figura 5.5.2.2.4. Mucosa gástrica. Región antral. Ausencia de *H. pylori* en los diferentes animales tratados con EFM. B. globosa.

3. Animales Grupo Patrón.

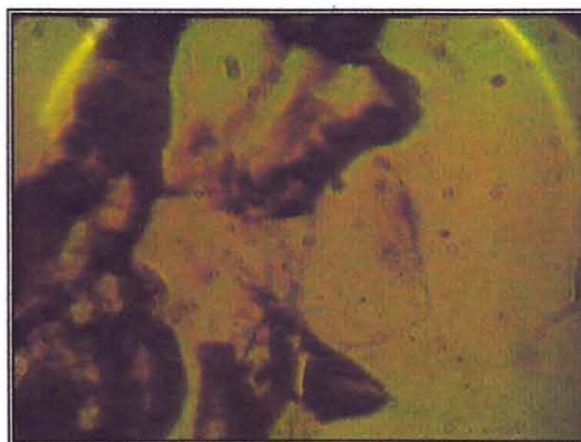
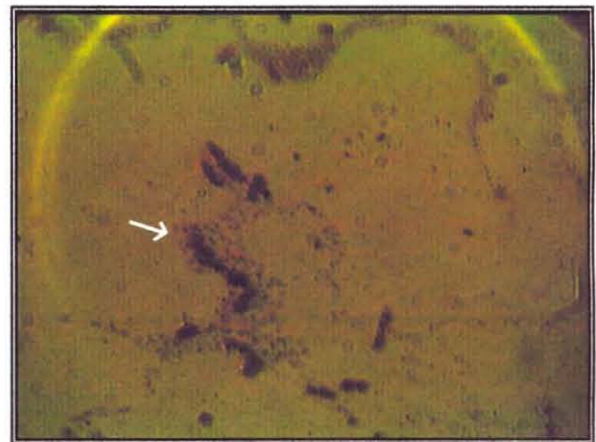
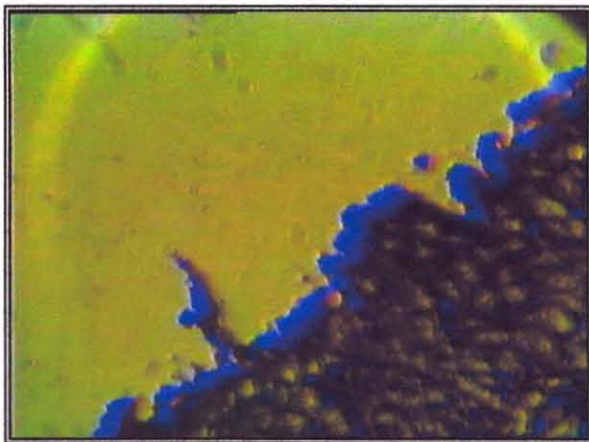


Figura: 5.5.2.2.5. Animales del grupo patrón.

5. 6. Efecto Del Extracto Etanólico De *B. globosa* Sobre La Contracción Inducida Por Acetilcolina Histamina Y Cloruro De Potasio En La Musculatura Lisa De Íleon De Rata

Resultados

Se verificó un efecto relajante del *Buddleia globosa* sobre las contracciones inducidas por Acetilcolina 10^{-4} M. Este efecto se mostró marcado en todas las preparaciones (Figura 29) presentando un porcentaje de inhibición de $89\% \pm 10,5\%$.

En el Cuadro 30 se observa los resultados obtenidos con *Buddleia globosa* en las contracciones inducidas por Histamina, mostrando un inhibición del $46\% \pm 24\%$.

Cuadro 23 : Efecto del Extracto Etanólico de *Buddleia globosa* sobre las contracciones inducidas por ACh²

N	Primera Contracción Basal (cm)		Segunda Contracción en presencia de <i>Buddleia globosa</i> (cm)		Porcentaje de Inhibición ³
	Máxima Intensidad (A)	Mínima Intensidad (B)	Máxima Intensidad (C)	Mínima Intensidad (D)	
1	2,1	0,7	2,3	0,0	100%
2	6,8	5,0	7,8	0,8	86%
3	2,0	0,8	1,8	0,0	100%
4	5,2	1,5	3,5	0,3	79%

¹ Extracto de *Buddleia globosa* 0,2 mL agregados en la cámara del sistema de órganos aislados luego de haber alcanzado la máxima intensidad en la segunda contracción

² Las contracciones fueron inducidas por ACh 10^{-4} M.

³ El porcentaje de inhibición (PI) es calculado con la siguiente fórmula:

$$PI = \left(1 - \frac{D \times A}{B \times C} \right) \times 100$$

Cuadro 24 : Efecto del Extracto Etanólico de *Buddleia globosa*⁽¹⁾ sobre las . Contracciones inducidas por Histamina⁽²⁾

N	Contracción (cm) en ausencia de <i>Buddleia</i> <i>globosa</i> (A)	Contracción (cm) en presencia de <i>Buddleia</i> <i>globosa</i> (B)	⁽³⁾ Porcentaje de inhibición
1	7,4	5,2	30%
2	2,0	1,2	40%
3	3,8	2,7	29%
4	1,5	0,3	80%

⁽¹⁾ Extracto de *Buddleia globosa* 0,2 mL agregados en la cámara del sistema de órganos aislados luego de haber alcanzado una contracción tónica estable inducida por Histamina 10^{-4} M.

⁽²⁾ Las contracciones fueron inducidas por Histamina 10^{-4} M.

⁽³⁾ El porcentaje de inhibición (PI) es calculado con la siguiente fórmula:

$$PI = \left(1 - \frac{B}{A} \right) \times 100$$

Cuadro 25 :

Resultados " Efecto de la Acetilcolina y E F *B. globosa* + Acetilcolina sobre la EC₅₀ en ileon de rata"
Modelo Curva Dosis- Respuesta.

Concentración Moles 10 ⁻	Altura promedio EN Ausencia de E. F. <i>B. globosa</i>	Porcentaje (%)	Altura promedio en presencia de E F <i>B. globosa</i>	Porcentaje (%)
9	4.25 ± 1.78	6.48	2.0 ±1.0	3.20
8.5	8.75 ± 2.38	13.35	4.2 ±0.7	6.77
8.0	14.25 ± 2.48	21.75	8.5 ±1.2	13.70
7.5	28 ± 3.08	42.27	15.1 ±1.6	23.96
7.0	34.75 ± 2.94	53.05	26.4±3.2	41.90
6.5	45.5 ± 4.55	69.46	43.2 ±3.5	68.57
6.0	55.5 ± 2.59	84.73	60.4±4.5	97.41
5.5	65.5 ± 3.90	100.00	62±4.5	100.00
5.0	65 ± 3.00	99.23	62±3.1	100.00
4.5	62.25± 2.68	95.03	61±3.1	98.38

De la evaluación de los datos se obtiene EC₅₀ (Concentración Efectiva Media) y corresponde para Acetilcolina = 10⁻⁷ M. Y para el EC₅₀ en presencia de EF. *B. globosa* 10^{-7.5} M. Generando así un desplazamiento de la curva ligeramente a la derecha.

VI. DISCUSIÓN

Partiendo del supuesto de que una forma farmacéutica está constituida por una o más sustancias activas responsables de su acción terapéutica y por adyuvantes sustancias que viabilizan la administración y el mantenimiento de la cualidad de medicamento, debemos de considerar a los productos vegetales como los abastecedores de insumos para la elaboración de medicamentos desde el punto de vista industrial así como para su utilización inmediata por la población doliente que lo requiere.

El presente trabajo de investigación se constituye en un modelo de Evaluación Farmacológica para plantas de acción antiulcerosa, es necesario destacar que el aporte científico que presentamos permitirá a la población que utiliza el extracto de hojas de esta planta *Buddleia globosa* como medicina folklórica tenga la garantía de su acción farmacológica y se genere en la industria la posibilidad de continuar en la investigación hasta descifrar su composición química y elaborar una presentación farmacéutica que garantice su efecto terapéutico.

La *Buddleia globosa* hoppe conocida ampliamente como “matico” se desarrolla desde Santiago a Concepción en Chile. Es un arbusto silvestre y de fácil cultivo. En los estudios realizados en la parte fitoquímica del extracto fluido de *Buddleia globosa* (hojas y tallos) encontramos compuestos fenólicos de importancia como flavonoides, entre ellos Quercetina y Rutina, lo cual concuerda con los hallazgos de Farga 1990 (2), estos compuestos en la planta se constituyen como protectores de la incidencia de los rayos ultravioleta, citoprotectores contra virus, hongos e insectos, a su vez se conoce la actividad que realizan como atrapadores de radicales libres, antioxidantes; estos flavonoides generan en la planta una mayor calidad de vida frente a su ecosistema; también se presenta en su composición taninos constituyendo estos desde un 5.0 a 5,7 % .Mellado 1923(1), Harborne J. B 1984(21), la presencia de estos compuestos polifenólicos le confiere actividades biológicas de acción bactericida demostrada en nuestro estudio se discutirá posteriormente y según la literatura consultada para otras especies de fungicida, antitumoral (22,23) Farmacognosia 1999, e inhibidor de enzimas principalmente de microorganismos agresores tales como bacterias e. g. Streptococcus mutans y S. Sobrinus (20) Hattori et. Al 1990).

Se destaca así mismo la presencia de alcaloides en menos concentración a los compuestos antes citados.

En el estudio histológico realizado de la parte vulneraria que presentan la mayor actividad biológica, las hojas muestra excrecencias en determinadas células con la apariencia de bolsa oleífera, la cuál servirían de depósito de compuestos volátiles y aromáticos entre ellos los flavonoides e isoflavonas. La estructura morfológica estudiada corresponde a una planta con estructura secundaria.

En los estudios de solubilidad de compuestos se encontró que la mayor parte de los compuestos fenólicos se extraen con solvente polares entre ellos: Metanol y Etanol. El solvente medianamente polar Cloroformo también ejerce una buena extracción tanto de compuestos fenólicos como de alcaloides.

La actividad biológica mejor mostrada se obtuvo con el extracto fluido de *Buddleia globosa* (extracción con alcohol etílico), motivo por el cual se realizó las pruebas con este extracto, evaporando el alcohol y reconstituido con agua destilada.

De acuerdo al estudio de solubilidad realizado como mostramos en el cuadro N° 5 la mayor parte de los componentes químicos presentes en el extracto etanólico de *B. globosa* son de naturaleza polar y mediana polaridad.

Como observamos en el cuadro N° 6, el extracto etanólico contiene gran cantidad de compuestos fenólicos como un taninos y flavonoides las cuales concuerdan con lo reportado por Farga 1993 (2).

También se encontró alcaloides en menor cantidad.

Se confirmó mediante cromatografía en capa fina la presencia de fenoles, alcaloides y flavonoides lo que resume en el cuadro N° 7 (se aislaron 5 componentes utilizando cromatografía en columna las cuales se identificaron y purificaron mediante cromatografía en capa fina a escala preparativa).

El extracto etanólico total fue fraccionado mediante cromatografía en columna rápida utilizando solventes de polaridad creciente cuyo resultado se encuentra en el cuadro N° 8. De lo que se deduce la presencia de compuestos fenólicos tipo flavonoides y de alcaloides.

A partir del sub-extracto metanólico se realizaron ensayos cromatográficos probando distintas mezclas en el cuadro N° 9. Estos sistemas nos sirvieron para la identificación de los compuestos aislados tal como mostramos en el cuadro N°10.

Se aislaron 6 fracciones de las cuales se elucidó la estructura de las 5 primeras, mediante espectrofotometría Ultravioleta; por correlaciones químicas y mediante reacciones de desplazamiento (BRUNETON J.) como mostramos en las figuras y gráficos correspondientes; con lo que se propone la estructura de 5 flavonoides: **F1**: 6-Aquil – 4' – hidroxí – 7.0 – Glicosil Isoflavona, **F2**: 5,7,8 – Trihidroxí – 4' – O – Metil Flavona, **F3**: 5,7 – Dihidroxí – 6,8 – di-O – Metil Flavona, **F4**: 5,7 – Dihidroxí – 6,8 – Dialquil Flavona, **F5**: 6,8 – Dialquil – 4' – hidroxí – 7 – 0 – Metil Isoflavona, las cuales se reportan por primera vez en este investigación.

El empleo de los flavonoides en la terapéutica es vasto y a la vez empírico se le han atribuido efectos antitumorales, antivirales, citoprotectores, antirradicales libres, algunos medicamentos contienen flavonoides y están indicados principalmente para la circulación, reparación de tejidos mucosos tales como gingivales, vasos arteriales y venosos (20) Harborne J. B. 1986, actualmente se está dando mayor importancia a las isoflavonas debido a que suelen ser compuestos intermedios de mayor acción antioxidante biológicos, demostrado está que estos compuestos activos que se encuentran como parte integrante del extracto fluido de *B. globosa* nos permiten entender el efecto gastroprotector y antiulceroso que hemos determinado en los diferentes modelos experimentales de inducción ulcerativa que estamos presentando.

En el primer estudio de la actividad antiulcerosa del extracto etanólico de *Buddleia globosa* en la inducción a ulceración por efecto restricción e hipotermia encontramos que en todos los animales del grupo control se desarrollaron múltiples lesiones gástricas, lo que no se presentó en el grupo de animales que recibió *Buddleia globosa* generando una inhibición de ulceración del 85.71 %, resultado altamente significativo (Cuadro N° 19). Esto puede explicarse por la presencia de grupos constituyentes, especialmente flavonoides, tales como Rutina, Quercetina y las isoflavonas, las que actuarían como citoprotectores a nivel de la mucosa gástrica. Estos principios probablemente generan una respuesta inhibitoria de los componentes oxidantes liberados por los macrófagos o neutrófilos, tales como Superóxido y otros radicales libres los que causarían la inflamación y lesión del tejido; esta inhibición de la inflamación y ulceración sería por bloqueo del influjo de calcio y de la 5- Lipooxigenasa en la vía del metabolismo del Ácido Araquidónico tal como lo demuestra Murakami S.1992 (31).

Es también destacable el efecto de la Ranitidina como fármaco patrón con un 92.85% de inhibición de úlceras, efecto ampliamente documentado en la literatura Garrick T.1987(32); Ryberg B. 1990(33). El estrés causado por el frío y la inmovilización en los animales generan una disminución del moco protector de la mucosa e induce a una erosión hemorrágica en ésta que es atenuada por la Ranitidina, por bloqueo de los receptores H₂ con inhibición de la secreción ácida, e impidiendo mayor daño de la mucosa. Los bloqueadores de los receptores de H₁ y H₂ actúan por antagonismo competitivo con la histamina aunque sus estructuras químicas son marcadamente diferentes.

En preparados de células parietales aisladas se ha comprobado que existen tres receptores diferentes: para la gastrina, la histamina y la acetilcolina como lo demuestra, Bertaccini. G; 1988(33), lo que corrobora Prinz, C 1993- 1994:(34,35). Entre estos receptores existen interacciones fuertemente asociadas y sinérgicas. *In vivo* el principal efecto de la estimulación colinérgica es la secreción de ácido y posiblemente la estimulación de la gastrina; el que se ejerce a través de la liberación de histamina de los mastocitos de la mucosa, lo que demostró Wallace J. 1990(36). En este modelo se observó que existe gastroprotección de la mucosa gástrica por efecto del extracto de *B. globosa* lo que favorecería la similitud de bloqueo de la vía colinérgica así como de la histaminérgica.

En el modelo de inducción ulcerativa causado por estrés quirúrgico de ligadura del píloro e inmovilización se encontró que el volumen de secreción gástrica disminuye significativamente 62.19% (Cuadro N° 20), en el grupo de animales que reciben extracto fluido de *Buddleia globosa*, con respecto a los animales del grupo control, (comparativamente frente al patrón Ranitidina, que logra una disminución del 54.66%), esto nos confirmaría el efecto gastroprotector que presenta el extracto de *Buddleia globosa*, y sugeriría que su mecanismo de acción involucraría un bloqueo de los receptores H₂ ó una inactivación de la respuesta vagal. En el efecto sobre el pH se encontró diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al grupo control, disminuyendo la concentración de los protones desde 10^{-2} M a 3.7×10^{-3} M en el tratamiento con *Buddleia globosa* lo que favorece la menor lesión sobre la mucosa y la disminución de la respuesta ulcerativa. Conocemos que la célula parietal gástrica en reposo tiene una red de canales colapsados; cuando se estimulan estos por efecto de estrés se expanden como redes de canales,

originándose la secreción ácida dentro de los canalículos secretorios de las células parietales. El responsable de esta secreción activa a través de la membrana de los canalículos secretorios de la célula parietal es la adenosina 5 trifosfatasa dependiente de ATP. La bomba de ácido H⁺K⁺ATPasa es similar a la Na⁺K⁺ATPasa. Está compuesta de dos subunidades: la subunidad alfa compuesta de 1000 aminoácidos y la subunidad beta compuesta de 300 aminoácidos. La función de esta enzima es de transportar el H⁺ del citoplasma de la célula parietal al lumen canalicular y al mismo tiempo, intercambiar K⁺ de retorno al lumen canalicular. De este modo, la H⁺K⁺ATPasa es una bomba de contra transporte que intercambia H⁺ citosólico por K⁺ extra citoplasmático. Este transporte se logra por cambios de la enzima: fosforilación de la proteína por ATP en presencia H⁺ citoplasmático y desfosforilación por el K⁺ en el otro lado de la membrana. La acidez del espacio permite la acumulación de las bases débiles. Si estas son ácido lábiles y son convertidas a una sustancia que pueda reaccionar con la superficie externa de la bomba, resulta un inhibidor específico de la bomba. Los resultados de la disminución del volumen de secreción gástrica por el extracto de *B. globosa*, se explicarían por la composición de sus metabolitos secundarios entre ellos se encuentran sustancias heterocíclicas tipo flavonas e isoflavonas que se comportarían como inhibidores de la bomba H⁺k⁺ATPasa, lo que también ha sido demostrado por Murakami S. 1992 (31) y Beil W. 1995 (37) al trabajar en células parietales y la acción de flavonoides y Quercetina, las cuales inhiben la producción de histamina y la actividad de la H⁺K⁺ATPasa dependiente, generando de esta manera un efecto de gastroprotección.

Con respecto a la presencia de proteínas en el contenido gástrico que reflejan la presencia de enzimas como pepsina, no existió diferencia significativa entre los grupos (Cuadro ° 20).

Al utilizar el Subsalicilato de Bismuto como citoprotector de la mucosa gástrica y evaluar el contenido de cloruros, observamos que este grupo presenta una disminución significativa respecto al control, mientras que el tratamiento de *Buddleia globosa* no muestra variación alguna con respecto al control y Ranitidina. El efecto del Bismuto es de unirse a las proteínas en medio ácido formando una capa protectora en el lecho ulceroso, evitando así la fuerza erosiva del medio.

De estos hallazgos se distingue que el extracto de *Buddleia globosa*, presenta: taninos, flavonoides e isoflavonas cuyas estructuras químicas forman complejos con las proteínas en forma semejante al efecto del bismuto, lo que ejercería un efecto de gastroprotección en la mucosa en este segundo modelo de experimentación. .

El tercer modelo de inducción ulcerativa por efecto de la infección causada por el inóculo de *Helicobacter pylori* 10⁵ UFC x mL por animal y con un tratamiento de 15 días post infección; en los diferentes grupos infectados se encontró una respuesta diferente y bastante apreciable en el tejido gástrico; principalmente en la región antral los cuales se evaluaron por cortes histológicos con tinción de Fuccina –Eosina para evaluar normalidad del tejido y la tinción de plata Warthins Starry Donayre M. C.1993 (30); para identificar la presencia de *Helicobacter pylori* .

Elegimos este modelo debido a que realizamos previamente estudios *in Vitro* los cuales demostraron que el extracto fluido de *B. globosa* tiene actividad bactericida ante *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus*

áureos (ATCC 2 9213) y *Escherichia coli* (ATCC 25922), lo que nos permitió su empleo *in vivo*. Se pudo observar que a la concentración de 0.5 mg/dL presenta la actividad bactericida y a 0.25 mg/dL la actividad bacteriostática frente a cultivo de *H. Pylori* cepas silvestres aisladas de biopsias de tejido gástrico humano. En este modelo se generó la infección por inoculación intragástrica de *H. Pylori* viables, y se demostró la infección por el seguimiento de la implantación de este microorganismo en la membrana basal del epitelio gástrico en modelo piloto de 18 animales.

Así tenemos que en el Grupo **Agua destilada** (n = 20) El 90 % de los animales presenta *H. pylori*, al observar los diferentes cortes histológicos se evidencia la gran cantidad de *Helicobacter*, las mucosas del estómago se presenta congestivas e hiperhémicas (85%), Esto obedece a la presencia del ***Helicobacter pylori*** microorganismo que está alterando la estructura normal de la mucosa. Así mismo los pliegues se muestran hipertróficos en el 95% como reacción de respuesta a la injuria.

Se corrobora así mismo el estudio microscópico, mostrando los cúmulos de *H. Pylori* en la mucosa y se encontraron las formas bacilares de la bacteria forma en la cual se encuentra en total actividad (Figura 5.4.5.2), así como la respuesta inflamatoria intensa con aparición de células polimorfo nucleares en la submucosa.

La infección por *H. Pylori* conduce a la inflamación de la mucosa gastroduodenal y el grado de inflamación varía desde la inflamación leve a la crónica severa con destrucción epitelial focal. La carga infecciosa de los microorganismos *H. Pylori* en la región antral se corrobora con la carga de leucocitos polimorfo nucleares de la respuesta inflamatoria. El vínculo patogénico entre la infección por *H. Pylori* y la gastritis crónica, con o sin atrofia glandular es irrefutable. Tytgat GNJ.1994 (38).

En los cortes histológicos observados del grupo con el tratamiento de la combinación de Claritromicina; Ranitidina(39,40). y Subsalicilato de Bismuto una forma triple de ataque a la bacteria favoreciendo su erradicación, clínicamente demostrada razón por la que nos sirvió como modelo de comparación en nuestro esquema de tratamiento. Estas bacterias se disponen de preferencia en la zona antral y con la tinción de plata se identificó con mayor resolución las diferentes formas en las cuales suele vivir esta bacteria, En el tratamiento durante 15 días se evidencio una regresión a la normalidad de un 70% del grupo, y la erradicación de estas bacterias en igual porcentaje. En un 30% se observan las formas coco bacilares que se forman por una actitud de conservación de esta bacteria frente a un medio no adecuado para su supervivencia, lo que también destaca Willen R. 2000 (40); quién observa por microscopia electrónica esta forma coco bacilar como una manera de preservar las estructuras internas densamente acumuladas en el espacio periplásmico frente al medio inhóspito del ensayo. Este tratamiento se basa en la capacidad bactericida que presenta la Claritromicina antibiótico de amplio espectro y de primera elección para *H. Pylori*, el poder citoprotector que se atribuye al Subsalicilato de Bismuto al formar una película protectora sobre la mucosa gástrica impidiendo la erosión celular por efecto de la producción de ácido clorhídrico por las células parietales, lo que hace que sea un buen agente terapéutico, y por último demostrado está el efecto de la Ranitidina en el bloqueo de la Bomba H⁺K⁺ATPasa en la producción de H⁺, este forma de tratamiento con las tres drogas descritas se ha adoptado por la literatura médica consultada Mc Colm A A (1996), Lind et al. 1996(39).

Al evaluar al grupo de animales que recibió *B. globosa* durante los 15 días de tratamiento se evidenció que el 60% de los animales conservan la normalidad de las mucosa y se correlacionan con la normalidad de los pliegues y la disminución de las célula inflamatorias: eosinofilos en la lámina propia. Hay una reparación del tejido por la erradicación del *H. Pylori*. Mientras que el 40% de estos muestran hiperemia y con pliegues hipertrofiados, hecho que justificamos por el tiempo de tratamiento y el nivel de respuesta de los animales, la regresión de la infiltración celular mononuclear desde la lámina propia, en estos animales requiere de mayor tiempo. Al estudio microscópico de la región antro pilórica de los cortes se evidenció que sólo el 40% mostró la presencia de *Helicobacter pylori* en la forma de cocobacilos esta disminución de la población de bacterias demuestra que la actividad del extracto permite una mejor respuesta bactericida y reparativa de la mucosa antral injuriada, zona que ha demostrado que es el habitat de mayor afinidad topográfica, así como lo demuestra Bayerdorffer (1992).

La explicación a este efecto partiría desde dos puntos de vista:

1º.- El extracto tiene: Quercetina, Rutina, 6-Aquil – 4' – hidroxi – 7.0 – Glicosil Isoflavona, F2: 5,7,8 – Trihidroxi – 4' – O – Metil Flavona, F3: 5,7 – Dihidroxi – 6,8 – dio – Metil Flavona, F4: 5,7 – Dihidroxi – 6,8 – Dialquil Flavona, F5: 6,8 – Dialquil – 4' – hidroxi – 7 – 0 – Metil Isoflavona, los cuales se comportarían como citoprotectores de la mucosa gástrica, aumentando el pH, alterando así el metabolismo de la bacteria que está adaptada a un medio altamente ácido, pese a ser ácido sensible, por otro lado; está produce grandes cantidades de la enzima ureasa que hidroliza la urea del medio que lo rodea formando un halo protector de amoniaco que destruye la barrera mucosa protectora presente en el epitelio gástrico, el extracto ha demostrado tener efecto bactericida y bacteriostático *in Vitro* frente a *H. pylori*, ello probablemente por la presencia de los compuestos polifenólicos entre ellos taninos, que se han demostrado en otros estudios ser inhibidores enzimáticos y es muy probable que actuó en forma similar frente a la ureasa arma principal de esta bacteria, al estar inhibida esta enzima ya no formaría amoniaco a partir de la urea y la desestabilizaría o la vuelve más lábil. López-Brea Manuel (1995).

El efecto de los flavonoides, flavonas, e isoflavonas, principalmente en el conjunto destaca la Quercetina, que de acuerdo a Beil W.1995(37), Mesias S. 1992(42), en células parietales estimulan la producción de prostaglandinas E2, estos compuestos inhiben el crecimiento de *H. pylori*, lo que refuerza nuestros hallazgos.

Los resultados de eficacia son alentadores puesto que hemos empleado el extracto sólo ya que si posiblemente si se utilizará como coadyuvante en una terapia combinada en el tratamiento convencional de Claritromicina, Ranitidina y Subsalicilato de Bismuto generaría una mayor respuesta.

Se evaluó de manera inicial el efecto potencialmente relajante del *Buddleia globosa* en preparaciones de intestino, frente a contracciones inducidas por Histamina y Acetilcolina. Ambos fármacos son utilizados como estimulante de la musculatura lisa e involucran el empleo de receptores diferentes para producir el fenómeno contráctil. Prinz,C. 1995(35); Wallace J.1990(36). En el primer caso, la Acetilcolina actúa frente a receptores muscarínicos y en el segundo caso la Histamina lo hace a través de receptores

histaminérgicos tipo 1. Como puede observarse por los resultados mostrados en los cuadros 29 y 30 **Buddleia globosa** presentó un marcado efecto relajante en ambos protocolos experimentales. El procedimiento empleado permitió evidenciar un mayor efecto sobre las contracciones inducidas por Acetilcolina que sobre aquellas obtenidas con Histamina. Datos preliminares desarrollados por nuestro equipo de investigación sustentan igualmente un efecto relativamente menor sobre las contracciones inducidas por Cloruro de Potasio 100 mM. Acetilcolina es el neurotransmisor principal del sistema parasimpático, presentando efectos en diversos órganos y sistemas. En particular induce un marcado incremento en el tono, amplitud en las contracciones y actividad peristáltica del intestino, como se pudo verificar en los experimentos. Por su parte, la Histamina es inicialmente un autacoide preformado, encontrado principalmente en células cebadas y basófilos; sus acciones involucran fundamentalmente la participación en reacciones alérgicas, particularmente aquellas de hipersensibilidad. Presenta asimismo también un marcado efecto contráctil, en particular en músculo bronquial y como puede comprobarse en el presente estudio, en preparaciones de músculo intestinal Katzung 1999(43).

Las acciones de estos fármacos son mediadas por activación de la Proteína $G_q/11$, encargada de la estimulación de la actividad de Fosfolipasa C; el resultado inmediato es la hidrólisis de polifosfatos del fosfatidilinositol, formándose polifosfatos de inositol. El inositol trifosfato (IP3), es uno de los polifosfatos involucrados, que actúa preferentemente movilizando calcio intracelular Goodman y Goodman 1997 (8). Nuestros resultados muestran un marcado efecto relajante frente a ambos fármacos. Hasta donde he revisado, éste es el primer reporte del efecto relajante del **Buddleia globosa** sobre la musculatura lisa intestinal (Cuadro N ° 23). Sin embargo, la eficacia con la que este antagonismo fue observado, es también notoriamente diferente. El efecto sobre contracciones inducidas por ACh en comparación a la Histamina es relativamente mayor así como al de Cloruro de Potasio (datos preliminares, no publicados). El objetivo con el que se procuró mostrar el efecto relajante de **Buddleia globosa** frente a dos agonistas fue el de poder realizar una aproximación al posible mecanismo de acción involucrado.

En la medida que estos fármacos comparten el mismo mecanismo de acción a nivel intracelular, esperaríamos que si el efecto se realizase a través de una interferencia en los sistemas de transducción, el efecto relajante se presentase con intensidad aproximadamente similar frente a ambos fármacos. Por el contrario nuestros datos demuestran una consistente mayor eficacia del **Buddleia globosa** frente a ACh, no apoyando la hipótesis de una acción en la vía común intracelular.

Una segunda posibilidad a discutir es la posible acción sobre sistemas receptores diferentes en esta preparación, habiendo explorado en nuestros experimentos los receptores muscarínicos (que responden a ACh) y aquellos histaminérgicos 1 (que responden a Histamina) Bertaccini G. 1988 (33), Mesia, V. S 1992(42). Los receptores son estructuras macromoleculares altamente especializadas que confieren un elevado grado de selectividad y modulación fina a los procesos biológicos. La posibilidad de que el extracto de **Buddleia globosa** presente sustancias con potencial efecto farmacológico es apoyado por los estudios previos reportados (Mellado:1923) (Farga: 1990) . Desde este punto de vista estos resultados sugieren un efecto preferente sobre el receptor muscarínico, lo que se ha demostrado por el efecto del antagonismo encontrado en el modelo de Curva Dosis respuesta de Acetilcolina $EC_{50} = 10^{-7}$ M. Y para el EC_{50} en presencia de extracto etanólico de **B. globosa** $10^{-7.5}$ M. Sin embargo, es

conocido que aquellas sustancias con efecto bloqueador de receptores (antagonistas), cuando se administran en dosis elevadas, pierden la capacidad de selectividad de receptores, pudiendo explicar el efecto también observado tanto frente a Acetilcolina como a Histamina.

Finalmente es importante mencionar el carácter reversible del proceso, el cual se verificó en las preparaciones intestinales luego de ser expuestas a ***Buddleia globosa (Matico)*** y lavadas. Esto sustenta adicionalmente el potencial farmacológico relajante de la preparación así como el potencial terapéutico antiespasmódico de esta planta.

VII. CONCLUSIONES:

“El extracto fluido de *Buddleia globosa* (Matico), presenta actividad antiulcerosa de la mucosa gástrica, en los diferentes modelos experimentales realizados en nuestra investigación, lo que podría explicarse por :

1. El efecto inhibitorio de ulceración 85.71% ($p < 0.05$) frente al control en el modelo de Restricción e Hipotermia 4° C; la disminución significativa de la secreción ácida gástrica en el modelo de Ligadura de Píloro: Grupo Control 10.05 ± 1.54 mL y con B. globosa. 3.97 ± 1.19 ($p < 0.05$).
2. El extracto etanólico de B. globosa presenta en su composición: Quercetina, Rutina, Taninos, alcaloides, glicósidos y entre los compuestos aislados :
 - a. **F1:** 6-Aquil – 4' – hidroxí – 7.0 – Glicosil Isoflavona
 - b. **F2:** 5,7,8 – Trihidroxí – 4' – O – Metil Flavona
 - c. **F3:** 5,7 – Dihidroxí – 6,8 – di - O – Metil Flavona
 - d. **F4:** 5,7 – Dihidroxí – 6,8 – Dialquil Flavona
 - e. **F5:** 6,8 – Dialquil – 4' – hidroxí – 7 – 0 – Metil IsoflavonaLas cuales se reportan por primera vez en este investigación.
3. Ha demostrado tener efecto bactericida *in Vitro* frente a *Helicobacter pylori* (cepas nativas), así como frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 Y *Escherichia coli* ATCC 25922. En el tratamiento de animales de experimentación inoculados con cepas viables de *Helicobacter pylori*, el extracto fluido ha mostrado un 60% de recuperación de la normalidad del tejido.
4. El mecanismo de acción posible es por la interferencia en la vía de los receptores de Acetil Colina que genera un efecto relajante de la musculatura lisa intestinal demostrado al bloquear el efecto estimulador de la Acetilcolina *in Vitro*. También presenta efecto bloqueador en los receptores histaminérgicos, pero en menor potencia que los colinérgicos en musculatura lisa de duodeno e íleon de rata en esta investigación.

El extracto fluido de *Buddleia globosa* presenta un potencial terapéutico en la acción antiulcerativa y antiespasmódica, acciones demostradas en el presente trabajo de investigación.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Mellado Gutierrez.** Buddleia globosa lam. "Matico", "Panil"; Memoria de Prueba para optar el Título de Químico Farmacéutico. Universidad de Chile: 1923.
2. **Farga C.** Plantas de uso Medicinal en Chile. 1990.
3. **KNOP** Vademecum 1996. Laboratorio Homeopatía Alemana KNOP, Laboratorio Esp. Farmacéuticas KNOP. Santiago Chile.
4. **Manuel López-Brea.** *Helicobacter pylori*; "Microbiología, Clínica y tratamiento. Primera Edición, Ed. Mosby Doyma Libros 1995.
5. **Johnston B. J. Andmhali P.** Campilobacter like organism in duodenal and antral endoscopic biopsias: realtionship to inflammation. Gut 1985. 27, 1132-1137
6. **Rauws E. A; Langerberg W. Et.al** Campilobacter pylori associated Chronic Active Antral Gastritis. Gastroenterology 1988: 94: 33 - 40
7. **Harrisson,** Principios de Medicina Interna. 12da. Edición 1991.
8. **Goodmanm and Gilmann** Bases Terapéuticas de la Farmacología. 1996 Ed. Interamericana Mc. Graw Hill.
9. **Solari De La Fuente, M.** " Enfermedad ulcerosa clorhidropéptica" en Medicina. 1998
10. **Alvarado A.** Día. Vol. 3 N 2 Mar- Abril 1994 . 72-80.
11. **Bjorkman D. J.** Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug-Induced Gastrointestinal Injury. The American Journal of Medicine 1996 Vol. 101 : 25S - 32S.
12. **Senay E. C. Levin R.J.** Técnica de Senay y Levin. Ulcera Gástrica aguda inducida por inmovilización y frío. CYTED: Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. 1995
13. **Senay E. C. Levin R. J.** Synergism between cold and restrain for rapid production of stress ulcer in rat. Proc. Soc. Exp. Bio. 1967; 124: 1221-1223.

14. **CYTED** Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Técnicas de Investigación en Plantas Medicinales. 1995
15. **Placencia M.** Actividad Antiulcerosa del Extracto de *Piper angustifolium* en animales de Experimentación. CONCYTEC 1997.
16. **Arroyo A. J.** Actividad Antiulcerosa de *Piper angustifolium* (Matico) Tesis para optar al Grado de Doctor en Farmacia y Bioquímica Universidad Nacional Mayor de San Marcos 1998
17. **Aranivar S N.** *Piper angustifolium*, Principios químicos. Tesis U.P.C.H. 1985
18. **Rodríguez M.** *Piper stromachium*. Tesis U.N.M.S.M. 1943.
19. **Hattori M.; Kusumoto L.T.** Effect of tea polyphenoles on glucan synthesis by glucosyl transferase from *Streptococcus mutans*. Chem Pharm Bull 1990; 38: 717-20.
21. **Harborne J. B.; Stolze H.** Plant chemosystematics. London Academic 1984.
22. **Oliveira Simon, C.M.** Farmacognosia da planta ao medicamento 2000. Segunda Ed. Editora da Universidade UFRGS
23. **Trease G.E. Evans W.C.** Tratado de Farmacognosia, 12 Edición. Edit. Interamericana. 1986.
24. **Dominguez X.** Métodos de Investigación Fitoquímica. Ed. Limusa S.A. México; 1985.
25. **Lock De Ugaz O.** Investigación Fitoquímica Métodos en el Estudio de Productos Naturales: PUCP Fondo Editorial Lima 1º Edición 1988, 2º Edición Lima; 1994
26. **Bruneton J.** Pharmacognosy Phitochemistry Medicinal Plant Ed. Ltda. England U K; 1995.
27. **Mabry J, Markham K , Thomas M.** The Systematic Identification of Flavonoids. Ed. Springer Verlag ,Berlin: 1970
28. **Baker C. N.; Thornsberry C.** Inoculacum standarization in antimicrobial susceptibility test: evaluation of the overnight agar cultures and the Rapid Inoculum Standarization System. 1983 J. Clin Microbiol. 17: 450-457
29. **Sahm D. F.; Neumann C.; et. al.** 1988. Cumitech 25, Currente concepts and approaches to antimicrobial suceptibility testing. Coordinating ed. J.E. McGowan, Jr. American Society for Microbiology, Washington, DC.

30. **Donayre M. C.** Tinción de Plata para la investigación de *Helicobacter Pylori* en Biopsias de Tejido Gástrico. Tesis Profesional de Tecnología Médica. Universidad Cayetano Heredia. 1993.
31. **Murakami S, Marumatsu M, Otomo S.** Inhibition of gastric H⁺, K⁺.ATPase by quercetin. *J Enzyme Inhib*; 1992; 5:4, 293-8.
32. **Garrick T; Goto Y; Buack S; Guth P.** Cimetidine and Ranitidine protect against cold restraint-induced ulceration in rat by suppressing gastric acid secretion. *Dig. Dis. Sci*, 1987; Nov 32: 11, 1261-7rtfgvb54
33. **Bertaccini, G & Conuzi, G.** Regulation of receptors on parietal cells on acid secretion. *Scand J. Gastroenterol*; 1988; 23 (Suppl. 146): 22-33,
34. **Prinz C, Sachs G.** Histamine secretion from rat enterochromaffin like cells" *Gastroenterology*; 1993; 05: 449-461,
35. **Prinz C, Scott D.** Gastrin effects on isolated rat enterochromaffin like cells in primary culture". *Am. J. Physiol* 1994; 267 (Gastrointest, Liver Physiol. 30): G 663- G 675,
36. **Wallace J.** Mucosal Defense, New Advances for treatment of ulcer disease *gastroenterol Clinic North. Am.* 1990 : 19 : 87-100.
37. **Ryberg B, Tieleman Y.** "Gastrin stimulates the self-replication rate of enterochromaffin like cells in rat stomach. Effects of omeprazole, ranitidine and gastrin -17 in antrectomized rats". *Gastroenterology* 1990; 99: 935- 42.
38. **Tytgat G. N.** Consecuencias a largo plazo de la erradicación del *Helicobacter pylori*. *Scand J Gastroenterol* 1994, Supl. 205:38-44
39. **Lind T., Veldhuyzen van Zanten S. et al.** Eradication of *Helicobacter pylori* Using One-week Triple Therapies Combining Omeprazole with Two Antimicrobials: The MACH I Study *HELICOBACTER* 1996 Vol. 1: N 3 138-144.
40. **Willen R; Carlen B; Wang X:** Morphologic conversion of *Helicobacter pylori* from spiral to coccoid form Scanning (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) suggest viability. *Ups J Med Sci*; 2000; 105(1): 31- 40

41. **Yasutake K; Amano M; Mizokami Y.** Effects of Changing the Type of H₂ – Blocker in the Treatment of H₂-Blocker-resistan Ulcers: Comparison of Roxatidine Acetate Hydrochloride and Other H₂- Blockers. The Journal of International Medical Research 1998; 26:25-36
42. **Mesia S.** Actividad antiácida o antiulcerogénica del extracto acuoso de *Stachytarpheta cayannensis* Schau (gervao-roxo). XII Simposio de Plantas Medicinaiis do Brasil Curitiba, 1992.
43. **Beil W, irkholz C, Sewing K.** Effects of flavonoides on parietal cell acid secretion, gastric mucosal prostaglandin production and *Helicobacter pylori* growth. *Arzneimittelforschung*; 1995: Jun. (6): 697-700.